



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
Núcleo de Ciências Exatas e da Terra
Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente

**ESTUDO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS) ENVOLVIDAS NA
METILAÇÃO DO MERCÚRIO NA UHE - SAMUEL (RO)**

MARÍLIA HIGINO MUSSY

Porto Velho (RO)
2011

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
Núcleo de Ciências Exatas e da Terra

**ESTUDO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS) ENVOLVIDAS NA
METILAÇÃO DO MERCÚRIO NA UHE - SAMUEL (RO)**

MARÍLIA HIGINO MUSSY

Orientador: Prof. Dr. Gunther Brucha

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente. Área de concentração Meio Ambiente e Sustentabilidade, para a obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho (RO)
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Mussy, Marília Higinio.

M989e

Estudo das bactérias redutoras de sulfato (BRS) envolvidas na metilação do mercúrio na UHE – Samuel (RO). / Marília Higinio Mussy. Porto Velho, Rondônia, 2011.
80f.: il.

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Núcleo de Ciências Exatas e da Terra (NCET), Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente (PGDRA), Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Gunther Brucha.

1. Microrganismos. 2. PCR em tempo real. 3. Metilmercúrio. I. Título.

CDU: 543.272.81(811.1)

Bibliotecária Responsável: Eliane Gemaque / CRB 11-549

MARÍLIA HIGINO MUSSY

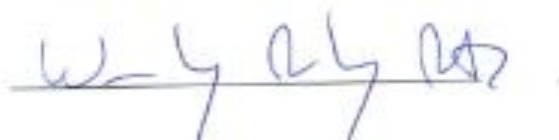
ESTUDO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS) ENVOLVIDAS NA
METILAÇÃO DO MERCÚRIO NA UHE - SAMUEL (RO).

Comissão Examinadora

Gunther Brucha



Wanderley Rodrigues Bastos



Marcio Rodrigues Miranda



Porto Velho, 19 de Dezembro de 2011

Resultado Aprovada

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me abençoar em meu trabalho;

Aos meus Pais e minha irmã por todo o apoio e dedicação, a eles sempre muito obrigada;

Aos meus professores orientadores Gunther Brucha, Wanderley Bastos e Myiuki Yamashita;

Aos meus amigos por toda a ajuda e companheirismo no lab. Ronaldinho, Marcio, Ígor, Beta, Walkimar, Denilça, Leidiane, Roberta, Susamar.

A todo o Laboratório de Biogeoquímica Ambiental Wolfgang C. Pfeiffer/UNIR;

Ao INCT-INPeTAm/CNPq/MCT (Processo Nº. 573695/2008-3), pelo apoio e pela bolsa concedida;

Ao mestrado de Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente/UNIR.

À Universidade Federal de Rondônia/UNIR

Ao Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM) -IMPPG/UFRJ da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ. Em especial ao Professor Dr. Alexandre Soares Rosado, à Professora Dra. Raquel Peixoto, a Deborah Leite e Flávia pela orientação e todo o auxílio em meu trabalho.

RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) é uma neurotoxina e tem a capacidade de bioacumular e biomagnificar tornando-se um risco à saúde humana. Embora os estudos apontem as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) como principal grupo microbiano envolvido na formação do MeHg e uma vasta variedades de espécies desse grupo serem capazes de metilar o mercúrio em culturas de laboratório, pouco se sabe sobre quais as BRS provenientes de biomas brasileiros estão envolvidas na metilação do mercúrio. Este trabalho teve como objetivo analisar e identificar as bactérias redutoras de sulfato (BRS) existentes no sedimento e a sua capacidade em metilar o mercúrio, na área do reservatório da Usina Hidroelétrica de Samuel, (Porto Velho, RO). Foram coletadas amostras de sedimento e água da UHE – Samuel para análise de MeHg, Hg-T e sulfato da água. Parte do sedimento foi utilizado em meios de culturas de enriquecimento das BRS e posteriormente feitos os ensaios de metilação do mercúrio na concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ com diferentes fontes de carbono (glicose, acetato de sódio, lactato de sódio) e um inibidor das BRS o molibdato de sódio. Nos ensaios de metilação foram avaliados as concentrações de sulfato, o crescimento bacteriano e as concentrações de Hg-T por espectrofotometria de absorção atômica por geração de vapor frio e MeHg por cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de fluorescência atômica. Foi realizado também a extração e quantificação do DNA das BRS pela técnica do Real Time PCR utilizando os genes *dsr1F* e *dsr4R*. Durante os ensaios de enriquecimento as BRS apresentaram um consumo de sulfato de 9 %. A biomassa medida através dos sólidos totais voláteis apresentou um bom crescimento microbiano, indicando resistência à concentração de Hg adicionada ao meio de cultura. A melhor taxa de metilação ocorreu no 2º ensaio microbiano (0,35 %) nos tratamentos com as fontes de carbono lactato/acetato. Os controles sem fontes de carbono também apresentaram taxas de metilação de 0,28 %. A análise da produção de metilmercúrio através da técnica do mercúrio radioativo mostrou-se um pouco mais sensível na detecção do metilmercúrio formado do que a análise no CG-AFS apresentando uma taxa final de metilação de 1,02 %MeHg/L/72 horas nos ensaios com fonte de carbono. O PCR em tempo real demonstrou a presença das BRS nos experimentos e apresentou maior abundância das BRS nos controles do que nas fontes de carbono lactato/acetato. Apesar de a quantificação ter sido maior nos controles, a metilação do Hg foi maior no lactato/acetato demonstrando que as fontes de carbono são necessárias para que uma maior produção de metilmercúrio ocorra.

Palavra chave: Microrganismos, PCR em tempo real, Metilmercúrio, Reservatório.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is a neurotoxin and has the ability to bioaccumulate and biomagnify becoming a risk to human health. Although studies have indicated that sulphate reducing bacteria (SRB) as main group involved in the formation of microbial MeHg and a wide variety of species of this group being able to methylate the mercury in laboratory cultures, little is known about which the BRS from biomes Brazilian are involved in methylation of mercury. This study aimed to analyze and identify the sulfate-reducing bacteria (SRB) present in the sediment and its ability to methylate mercury in the reservoir area of the hydroelectric plant of Samuel, (Porto Velho, RO). Samples of sediment and water were collected in the HPP - Samuel for analysis of MeHg, THg and sulfate water. Part of the sediment was used in culture medium for enrichment of BRS testing and subsequently made methylation of mercury at a concentration of $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ with different carbon sources (glucose, sodium acetate, and sodium lactate) and an inhibitor SRB of sodium molybdate. In methylation assays were evaluated concentrations of sulfate, bacterial growth and the THg concentrations by atomic absorption spectrophotometry by cold vapor and MeHg by gas chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometer. It was also performed DNA extraction and quantification of SRB by Real Time PCR technique using genes *dsr1F* and *dsr4R*. During the tests the enrichment BRS showed a consumption of sulphate 9%. The biomass measured by the total volatile solids showed a good microbial growth, indicating resistance Hg concentration added to the culture medium. The best rate of methylation occurred in the 2nd microbial assay (0.35%) in the treatments with the carbon sources lactate / acetate. The controls without carbon sources also showed methylation rates of 0.28%. The analysis of the production of methylmercury through the technique of radioactive mercury proved to be a little more sensitive in the detection of methylmercury formed than in CG-AFS analysis presenting a total end methylation of 1.02% MeHg/L/72 hours in tests carbon source. The real-time PCR showed the presence of SRB and the experiments showed greater abundance of SRB in controls than in carbon sources lactate/acetate. Although the measurement was higher in controls, methylation of Hg was greater in lactate/acetate demonstrating that the carbon sources are required for a higher production methylmercury occurs.

Keyword: Microorganisms, Real Time PCR, Methylmercury, Reservoir.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo global e local do Hg (Fonte: DINIZ, 2010).....	20
Figura 2 Reações de metilação que ocorrem em ambientes aeróbios e anaeróbios.	25
Figura 3. Área de estudo, ponto de coleta M05.....	34
Figura 4. Local de estudo da UHE de Samuel.....	35
Figura 5. Fluxo de N ₂ no meio de cultura (A) e incubação e agitação constante na incubadora (B).....	37
Figura 6. Meios de cultura com diferentes fontes de Carbono.....	39
Figura 7. Reatores da segunda metilação do mercúrio pelas BRS.	40
Figura 8. Extração do Hg-T (A). Análise do Hg-T no FIMS (B).....	41
Figura 9. Análise de Hg-T no sedimento e nos ensaios de enriquecimento e metilação (BASTOS et al, 1998).	42
Figura 10. Processo de extração do MeHg (A). E análise das amostras no CG-AFS (B).....	43
Figura 11. Análise de MeHg nas amostras de sedimento, ensaios microbianos e água (EPA 1630, 2001).....	44
Figura 12. Extração do metilmercúrio radioativo em funil de separação (A) e transferência para frascos de cintilação (B).	46
Figura 13. Reação da amplificação do DNA das BRS (A). Análise no Real Time PCR (B).	48
Figura 14. Intensidade da Correlação entre oxigênio dissolvido e profundidade.	50
Figura 15. Intensidade da Correlação entre temperatura e profundidade.....	50
Figura 16. Intensidade da Correlação entre potencial de óxido redução e profundidade.....	51
Figura 17. Intensidade da Correlação entre concentração de Sulfato e profundidade.	52
Figura 18. Intensidade da Correlação entre concentração de MeHg e profundidade no reservatório de Samuel.	54
Figura 19. Concentração dos sólidos totais voláteis (STV). Primeiro ensaio de metilação (A) e segundo ensaio de metilação (B).	Erro! Indicador não definido.
Figura 20. Primeiro ensaio de metilação pelas BRS, tempo de 120 horas. Concentrações entre cada réplica (A) e média final entre as réplicas (B).	57
Figura 21. Segundo ensaio de metilação pelas BRS. Tempo de 168 horas.	58
Figura 22. Produção do metilmercúrio ao longo dos 8 dias de experimento.	59
Figura 23. Avaliação da produção de metilmercúrio radioativo nos ensaios de metilação. ...	60
Figura 24. Concentração de Hg-T nos 2º ensaio de metilação.....	62
Figura 25. Coloração de gram nos ensaios de metilação do Hg.....	62

Figura 26. Quantificação da extração do DNA total nos ensaios de metilação do Hg. CTR=controle e LA=lactato/acetato.....63

Figura 27. Quantificação do DNA das BRS pela técnica do Real Time PCR. T0C= tempo inicial do controle, T168C= tempo final do controle, T0LA= tempo inicial do lactato/acetato e T168LA= tempo final do lactato/acetato..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meio Postgate C (Ilhan-Sungur et al., 2007).	36
Tabela 2. Concentração final, massa e volume dos reagentes e soluções usados nos ensaios de metilação.....	38
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da coluna d'água do ponto de coleta M05	49
Tabela 4. Concentrações de sulfato nas amostras de água da UHE - Samuel.....	52
Tabela 5. Valores de metilmercúrio presentes nas amostras de água da UHE - Samuel e outros trabalhos.	53
Tabela 7. Composição da solução traços de metais.....	77
Tabela 8. Composição da solução de vitaminas.	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

°C – Graus Celsius

$\mu\text{g.g}^{-1}$ – Micrograma por grama

$\mu\text{g.kg}^{-1}$ – Microgramas por quilo

$\mu\text{g.L}^{-1}$ – Microgramas por litro

μm – micrômetro

BRS – Bactéria Redutora de Sulfato

CG-AFS – Cromatografia Gasosa Acoplado ao Espectrofotômetro de Fluorescência Atômica

Cond – Condutividade

COSIPA - Companhia Siderúrgica de São Paulo

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

DGGE - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

Eh - potencial de oxi-redução

EPA – Agência de Proteção Ambiental

FIMS – *Flow Injection Mercury System*

g/L – Gramas por litro

Hg – Mercúrio

Hg-T – Mercúrio total

L - Litro

m – Metros

MeHg – Metilmercúrio

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mV – Milivolts

N₂ - Nitrogênio

ng.g^{-1} – Nanograma por grama

nm – Nanômetros

O₂ – Oxigênio

OD – Oxigênio dissolvido

ORP – Potencial de óxido redução

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

ppb – Parte por bilhão

pH – Potencial Hidrogênico

ppm – Parte por milhão

rpm – Rotações por minuto

rRNA - Ácido Ribonucleico ribossômico

SSF - Sólidos suspensos fixos

SST - Sólidos suspensos totais

STV – Sólidos Totais Voláteis

TDS – Total de sólidos dissolvidos

Temp – temperatura

UHE – Samuel – Usina hidrelétrica de Samuel

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. O MERCÚRIO	15
2.2. O MERCÚRIO NA AMAZÔNIA.....	16
2.2.1. O mercúrio na Usina Hidrelétrica de Samuel.....	16
2.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO MERCÚRIO.....	18
2.4. CICLOS BIOGEOQUÍMICOS DO MERCÚRIO	20
2.5. O PAPEL DO SEDIMENTO NA CICLAGEM DO MERCÚRIO.....	21
2.6. O METILMERCÚRIO	22
2.6.1. Processos da formação do metilmercúrio no ambiente	23
2.7. BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO.....	26
2.7.1. Ferramentas moleculares para o estudo das BRS.....	28
2.8. O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E A MICROBIOLOGIA AMBIENTAL	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. GERAL:.....	32
3.2. ESPECÍFICOS:	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. EQUIPAMENTOS	33
4.2. ÁREA DE ESTUDO	33
4.3. LAVAGEM E DESCONTAMINAÇÃO DAS VIDRARIAS	35
4.4. ATIVAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DAS BACTÉRIAS REDUTORA DE SULFATO (BRS).....	35
4.5. PRIMEIRO ENSAIO DE METILAÇÃO PELAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	37
4.6. SEGUNDO ENSAIO DE METILAÇÃO PELAS BRS.....	39
4.7. Mercúrio Total (Hg-T).....	40
4.8. ANÁLISE DE MeHg	43
4.9. ENSAIO DE METILAÇÃO COM MERCÚRIO RADIOATIVO	45
4.10. ANÁLISE DE SULFATO.....	46
4.11. ANÁLISE DE SÓLIDOS TOTAIS VOLÁTEIS	47
4.12. QUANTIFICAÇÃO DAS BRS PELA TÉCNICA DO PCR EM TEMPO REAL	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. AMOSTRAS AMBIENTAIS DA UHE-SAMUEL.....	49
5.1.1. Parâmetros físico-químicos	49
5.1.2 Avaliação do sulfato	51
5.1.3 Sólidos totais voláteis	52
5.1.4. Resultados do Hg-T e MeHg	53
5.1.4.1 Sedimento e água.....	53
5.2. ENRIQUECIMENTO	55
5.3. ENSAIOS DA METILAÇÃO DO Hg PELAS BRS	55
5.4. Quantificação das BRS pelo Real Time PCR.....	63
CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	75

INTRODUÇÃO

O estudo do mercúrio na Amazônia iniciou-se nos anos 80 com a vinda do garimpo de ouro para a região. Toneladas desse metal foram despejadas nos rios amazônicos durante o auge da mineração (décadas de 70 a 80) levantando a preocupação no meio científico da toxicidade do mercúrio para os seres humanos e os riscos da metilação no ambiente (BASTOS, 1997).

Estudos posteriores na Amazônia afirmam a presença de um mercúrio natural em seus solos. Este mercúrio aderido aos óxi-hidróxidos de ferro presente em grande quantidade na região são lixiviados para os leitos dos rios devido aos desmatamentos e queimadas ocorrentes na região, além do mercúrio oriundo da deposição atmosférica (ROULET et al, 1998). Desta forma mesmo com a significativa redução do garimpo de ouro em meados dos anos 90, ainda hoje são encontradas elevadas concentrações de mercúrio nos peixes e na população ribeirinha.

A especiação química do mercúrio em sua forma mais tóxica, o metilmercúrio (MeHg), desperta grande interesse do ponto de vista ecotoxicológico, uma vez que o MeHg tem tendência de bioacumular e biomagnificar ao longo da cadeia trófica tornando-se um risco a saúde humana. Essa tendência é maior devido a sua ação proteofílica quando comparada a outras espécies químicas do mercúrio. Além disso, o metilmercúrio possui uma alta afinidade com os grupamentos sulfidrilas das proteínas (MIRANDA et al, 2007).

A eficiência da metilação biótica do mercúrio depende da atividade microbiana e da concentração de mercúrio biodisponível, mais do que da quantidade de mercúrio existente no ambiente (MIRANDA et al, 2007). Um ambiente pode se tornar fonte ou sumidouro de metilmercúrio dependendo da ação das bactérias presentes nos sedimentos em metilar ou desmetilar particulados ricos em Hg^{2+} (BISINOTI & JARDIM, 2004).

Compeau & Barta (1985) desenvolveram estudos para avaliar a eficiência da metilação por bactérias e constataram que o grupo das bactérias redutoras de sulfato (BRS), são as principais metiladoras do Hg^{2+} , e embora relate que a metilação abiótica ocorra, esta representa menos 0,1 % do metilmercúrio formado por metilação dos microrganismos de sedimento.

Este grupo de bactérias é bastante difundido na natureza podendo ser encontrado tanto no ambiente aquático quanto no ambiente terrestre, mas ocorre principalmente em sedimentos, onde as condições redutoras são mais favoráveis. Estas bactérias são de grande

importância para a remediação de ambientes contaminados pelas mais diferentes substâncias tóxicas (PATRÍCIO, 2009).

Embora os estudos apontem as BRS como principal grupo microbiano envolvido na formação do metilmercúrio, e uma vasta variedades de espécies de BRS serem capazes de metilar o mercúrio em culturas de laboratório pouco se sabe sobre quais as BRS provenientes de biomas brasileiros estão envolvidas na metilação do mercúrio.

Este estudo está voltado para o reservatório da usina hidrelétrica de Samuel – Rondônia. O represamento de um rio lótico para um lago lântico favorece a sedimentação do local e a presença de grande quantidade de matéria orgânica, oriunda da decomposição da floresta inundada, juntamente com o solo vindo de áreas desmatadas que é lixiviado para o corpo d'água, favorecendo a estratificação desse sedimento ao longo dos anos e o crescimento de bactérias capazes de metilar o mercúrio (TUNDISI, 2007).

Entender, portanto, os processos envolvidos na metilação do mercúrio, como também os agentes envolvidos nessa metilação é de grande importância para buscarmos a compreensão da ciclagem do mercúrio no ambiente tropical, e também para utilizarmos desse conhecimento no tratamento de áreas contaminadas por esse metal.

Esse projeto tem como finalidade avaliar a metilação do mercúrio pelos microrganismos existentes no sedimento na área do reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel, (Porto Velho, RO) com ênfase nas BRS e quantificar o grupo das BRS com o auxílio do Real Time PCR presentes nesse sedimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O MERCÚRIO

Os relatos da utilização do mercúrio pelo homem têm sido descritos há milhares de anos e suas utilizações eram desde compostos mercuriais para tratar males dos olhos, ouvidos, pulmões, intestinos, e para forçar contrações uterinas em partos difíceis até nos processos de amalgamação utilizados para formar as ligas de ouro ou prata (AZEVEDO & RAMOS, 1993).

O mercúrio tem chamado a atenção durante a última década do século XX, por ter se tornado um poluente global e por ser um metal de difícil retenção em processos de controle de emissão de combustão (AZEVEDO et al, 2001).

O mercúrio é neurotóxico e seu efeito tóxico depende da forma química, da dose, do tempo de exposição e da taxa de administração (BISINOTI, 2002). O mercúrio em uma de suas formas orgânicas mais tóxicas: o metilmercúrio (MeHg) tem efeito proteofílico nos organismos sendo acumulado em seus tecidos ao longo de sua vida através da alimentação a este fenômeno dá-se o nome de bioacumulação. O metilmercúrio também se acumula ao longo da cadeia trófica. Os predadores de topo de cadeia apresentarão concentrações mais elevadas quando comparadas aos de níveis tróficos inferiores, pois o MeHg presente em suas presas será somado ao que eles já possuem (AZEVEDO et al, 2001).

Um dos acidentes de maior repercussão e que chamou a atenção para a toxicidade do mercúrio foi o caso de Minamata no Japão, em 1956. A empresa Nippon Nitrogen Fertilizer utilizava sulfato de mercúrio como catalisador na produção do ácido acético e cloreto de mercúrio na catálise do cloreto de vinila. Parte deste mercúrio também era metilado durante o processo de metilação do acetileno, e os rejeitos juntamente com este metal eram lançados diretamente na baía de Minamata. 2252 pessoas foram diretamente contaminadas pelo metilmercúrio, sendo que dentre elas ocorreram 1043 óbitos (ROSA, et al, 2003).

Esse acontecimento e diversos outros que ocorreram em indústrias que utilizam o mercúrio como as de cloro-soda e também a preocupação com a saúde dos mineradores nas minas de ouro, foram responsáveis pelo início de várias conferências sobre o meio ambiente e pelo incentivo de grandes números de pesquisas focadas na relação homem natureza (DINIZ, 2010). No Brasil essas pesquisas tem se voltado principalmente para a Amazônia, onde as concentrações de mercúrio no meio ambiente e na população ribeirinha são altos, devido não somente aos garimpos de ouro que ocorreram e ainda ocorrem na região, mas também à presença de mercúrio natural presente nos solos da região.

2.2. O MERCÚRIO NA AMAZÔNIA

A Amazônia teve seu ápice na mineração do ouro nas décadas de 70 à 90, estima-se que neste período os lançamentos de Hg na bacia do Rio Madeira oscilaram entre 10 e 50 t por ano (BASTOS, 1997). A mineração de ouro na bacia do Rio Madeira começou a decair a partir de 1995, onde diminuiu significativamente os lançamentos de mercúrio no rio (BASTOS et al, 2006).

Todo este mercúrio lançado nas últimas décadas pela atividade mineradora vem sofrendo oxidação e metilação nas condições propícias das águas e sedimentos dos rios, contaminando as populações ribeirinhas, através da ingestão de peixes (SOUZA & BARBOSA, 2000). Em associação a isto está o mercúrio natural presente nos solos da Amazônia, como também as emissões globais (MALM et al, 1995; ROULET et al, 1998) que com o desmatamento e queimadas para o desenvolvimento da agricultura, esse mercúrio acaba por ser lixiviado para o leito dos rios sendo atualmente uma das principais formas de contaminação do ambiente aquático por mercúrio (ROULET et al, 1998).

As conseqüências do lançamento do Hg no ambiente aquático, tanto oriunda da atividade garimpeira, do desmatamento ou da queima de florestas, é o transporte deste Hg para áreas de lago e igarapés de floresta inundada adjacentes da bacia do rio Madeira (ALMEIDA et al, 2005). Este mercúrio deposita-se rapidamente nos sedimentos apresentando mobilidade muito baixa. Em rios ricos em matéria orgânica, particularmente os de água preta, as condições físico-químicas facilitam as reações de organificação desse mercúrio (LACERDA & PFEIFFER, 1992).

2.2.1. O mercúrio na Usina Hidrelétrica de Samuel

O reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel está localizado na sub-bacia do rio Jamarí a 52 km da capital Porto Velho - RO. O rio Jamarí nasce à sudoeste da Serra do Pacaás Novos, desembocando na margem direita do Rio Madeira (NASCIMENTO, 2006). A construção da barragem foi iniciada em 1982 e finalizada em 1988, começando a funcionar em 1989 com a finalidade de abastecer o sistema Acre-Rondônia (FEARNSIDE, 2005; NASCIMENTO, 2006).

A construção da UHE de Samuel se iniciou antes mesmo do Estudo de Impacto Ambiental (EIA) e do Relatório de Impacto sobre o Meio Ambiente (RIMA) (FEARNSIDE,

2005) gerando ao final de sua construção um gigantesco impacto ambiental, alagando grandes áreas florestais.

Não somente Samuel, mas todas as outras represas construídas na Amazônia sem planejamento tiveram grandes áreas alagadas, pouca geração de energia e alterações ambientais tanto a montante como a jusante do reservatório, como exemplo podemos citar: Balbina e Tucuruí (JUNK & MELLO, 1990; TUNDISI, 2007). Novas usinas hidrelétricas já estão sendo construídas nos rios amazônicos como é o caso da UHE de Jirau e Santo Antônio no rio Madeira, sendo esse um rio muito rico em carga sedimentar e que ao ser represado pode estar sujeito a graves problemas ambientais e socioeconômicos.

Com o represamento e a formação de um lago artificial o ambiente que era lótico (de águas correntes) torna-se lêntico (com água parada), então todo o material particulado em suspensão começa a se depositar no fundo do rio tornando este mais transparente. A incidência da luz na água se torna mais penetrante aumentando a temperatura do lago (BRANCO, 1990). Com a redução da velocidade e o aumento dos nutrientes por causa da lixiviação do solo e da decomposição da floresta inundada inicia-se um aumento de plantas aquáticas, microalgas e outros organismos que conseguem se desenvolver melhor nestes ambientes. Reduzindo desta forma muitas espécies principalmente de peixes (JUNK & MELLO, 1990; FEARNside, 2005; TUNDISI, 2007).

O sedimento depositado no fundo do reservatório, oriundo da precipitação do material particulado, da lixiviação do solo inundado e da erosão causada pelo desmatamento para ocupação da área, como é o caso do reservatório de Samuel, pode ficar estratificado durante anos. E com a decomposição da matéria orgânica esse ambiente acaba se tornando anóxico e propício para a metilação do mercúrio (FEARNside, 2005; MALM & LACERDA, 2008).

Minerações clandestinas também são encontradas próximas ao reservatório principalmente de cassiterita (minério de estanho) tendo como efeito negativo a sedimentação mais rápida do reservatório de Samuel (FEARNside, 2005; NASCIMENTO, 2006; KASPER, 2008).

Viana (2002) em um estudo sobre o monitoramento dos parâmetros físico-químicos pós-represamento do rio Jamarí no reservatório de Samuel (RO) encontrou significativas alterações nas concentrações de oxigênio durante o período de um ano e meio de monitoramento. No período de águas altas, o oxigênio dissolvido (OD) mantinha concentrações saturadas de 7-8 mg L⁻¹ e no período de águas baixas a concentração diminuía para 1,5-3 mg L⁻¹.

Nascimento (2006) também encontrou diferenças consideráveis no que diz respeito à concentração de mercúrio da comunidade planctônica dentro da barragem do reservatório de Samuel. No período de águas baixas (junho) a concentração de mercúrio foi de $0,118 \text{ mg kg}^{-1}$ e no início do período chuvoso (novembro) a concentração de mercúrio foi de $0,022 \text{ mg kg}^{-1}$.

Desse modo podemos perceber que existem diferenças de concentrações entre as estações amazônicas, e no caso do mercúrio este se apresenta mais concentrado no período de águas baixas do que no período de águas altas. Fazendo então uma relação com o estudo de Viana (2002) as condições anóxicas do período da seca juntamente com as condições de pH ácido podem favorecer a biodisponibilidade do Hg para coluna d'água. E devido a diversidade e atividade de bactérias metiladoras do mercúrio estas podem intensificar o processo de transferência trófica do MeHg produzido.

Malm et al (1995) avaliou a concentração de mercúrio em peixes carnívoros dois anos após o enchimento do reservatório de Samuel e encontrou uma média da concentração de mercúrio total de $0,33 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco.

Atualmente ainda são encontrados valores altos de mercúrio na UHE-Samuel, como sugere o trabalho desenvolvido por Holanda (2008), em espécies de peixes *Serrasalmus rhombeus* com concentrações de mercúrio de $0,625 \text{ mg kg}^{-1}$ e *Cichla monoculus* $0,699 \text{ mg kg}^{-1}$. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a concentração de mercúrio para consumo humano de peixes não deve exceder $0,500 \text{ mg kg}^{-1}$. Porém para a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o valor para consumo de peixes carnívoros é de $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$ e de $0,500 \text{ mg kg}^{-1}$ para peixes não carnívoros.

O estudo do mercúrio em reservatórios de construções hidrelétricas é muito importante para se avaliar os processos da metilação que é favorecido principalmente pelas condições anóxicas. A área de estudo estabelecida está à montante do reservatório onde foi encontrado um baixo potencial redox que favorece a presença de bactérias redutoras de sulfato, objeto de estudo deste trabalho já que são consideradas as principais metiladoras do mercúrio.

2.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO MERCÚRIO

A palavra mercúrio vem do grego "Hidrargyros" (hydro, elemento de composição com o sentido de água, mais árgyros = prata) o Hg é um elemento químico de número atômico 80 (AZEVEDO et al, 1994). O mercúrio é o único metal encontrado na forma líquida em condições de temperatura e pressão normais, formando vapores incolores e inodoros. No

ambiente está associado a outros elementos químicos, formando compostos inorgânicos ou sais (CARDOSO et al, 2001).

Dentre os sais inorgânicos, o mais comum é o enxofre, com o qual forma o sulfeto de mercúrio (HgS) insolúvel, ocorrendo na forma de cinábrio usado como pigmento em tintas (CARDOSO et al, 2001). Outros sais importantes são o cloreto de mercúrio (HgCl_2), chamado também de sublimado corrosivo muito tóxico, o cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2), conhecido pelo seu antigo uso na medicina, e o fulminato de mercúrio $\text{Hg}(\text{CNO})_2$, detonador usado em explosivos (BISINOTI, 2002).

Os organomercurios são definidos pela presença de uma ligação Carbono-Hg covalente. Os compostos orgânicos mais prováveis de serem encontrados em condições ambientais são o cloreto de metilmercúrio (CH_3HgCl) e hidróxido de metilmercúrio (CH_3HgOH) e, em pequenas frações o dimetilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_6\text{Hg}$) (EPA, 1997).

O mercúrio pode existir em três estados de oxidação: metálica Hg^0 , mercurioso Hg_2^{2+} e mercúrico Hg^{+2} (EPA, 1997; SOUZA & BARBOSA, 2000). As propriedades e comportamento químico de mercúrio dependem fortemente da oxidação do estado. Mercúrio mercurioso e mercúrico podem formar vários compostos químicos orgânicos e inorgânicos. No entanto, o mercúrio mercurioso raramente é estável sob condições normais de ambiente (EPA, 1997). Uma característica muito importante do mercúrio é a de ser volátil. O Hg elementar (Hg^0) possui uma pressão de vapor elevada sendo encontrado no ambiente em maior quantidade na forma gasosa. Sua liberação natural ocorre a partir da crosta terrestre e por meio de vulcanismo (DINIZ, 2010).

No solo o pH é o principal fator que influencia na solubilidade deste elemento químico, além de também influenciar em sua especiação quando este estiver em solução (DINIZ, 2010). Em pH ácido grande quantidade de mercúrio é adsorvida no húmus, favorecendo a metilação. Já no pH básico o mercúrio fica adsorvido na fração mineral. Os complexos solúveis de mercúrio são adsorvidos pelo material particulado orgânico e inorgânico e a matéria fina em suspensão tem grande capacidade de adsorver o mercúrio dissolvido (BISINOTI, 2002).

O mercúrio tem alta correlação com carbonos orgânicos, argila, ferro, fósforo e enxofre dos sedimentos. Os agentes orgânicos complexantes solúveis em água, tais como humatos e fulvatos, podem quelar as espécies solúveis e insolúveis de mercúrio na água, os últimos precipitam-se diretamente da solução para o sedimento. Em condições aeróbias, parte do HgS presente no sedimento pode ser oxidado a sulfato, muito mais solúvel, mas este processo é muito lento e depende do potencial redox (BISINOTI, 2002).

2.4. CICLOS BIOGEOQUÍMICOS DO MERCÚRIO

O ciclo global do mercúrio é resultado de processos físicos, químicos e bioquímicos extremamente complexos, que podem ser alterados pelas atividades antrópicas diretas e indiretamente provocando a sua mobilização e remobilização do solo e da água. Nos últimos anos, algumas descobertas importantes ocorreram, sendo que, a descrição da formação do metilmercúrio encontrado a partir da metilação do Hg por bactérias aeróbias e anaeróbias, merece maior destaque (SILVEIRA et al, 1998; DINIZ, 2010).

Considera-se a existência de dois ciclos de transporte e distribuição do mercúrio no ambiente: um global e outro local (Figura 1). O ciclo de alcance global compreende a emissão natural de mercúrio pela gaseificação da crosta terrestre, emissões vulcânicas e evaporação natural de corpos d'água (AZEVEDO, 1993; SOUZA & BARBOSA, 2000). O ciclo local é favorecido pelas fontes pontuais antropogênicas como, por exemplo, o garimpo de ouro e as indústrias que utilizam mercúrio.

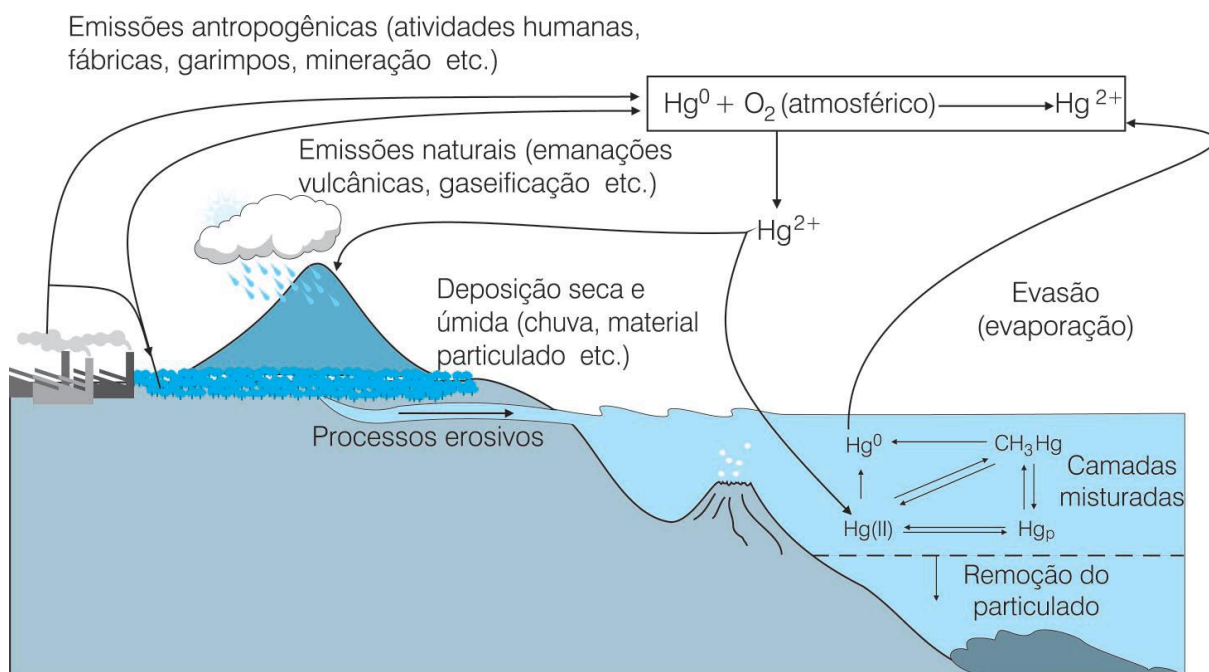


Figura 1. Ciclo global e local do Hg (Fonte: DINIZ, 2010).

A produção mundial de mercúrio é estimada em 10 mil toneladas por ano para uso nas mais diversas áreas, como indústrias, mineração e odontologia, sendo os principais produtores o Canadá, a Rússia e a Espanha. No Brasil o mercúrio metálico é usado em indústrias de cloro-soda, lâmpadas elétricas, pilhas, tintas, farmacêutica, explosivos, couro, madeira, têxtil; em artigos dentários, aparelhos elétricos, produção de produtos químicos, catalisadores para materiais plásticos, garimpo e outros (BISINOTI, 2002).

Tanto o mercúrio proveniente das fontes naturais, quanto aquele liberado por fontes antropogênicas, pode sofrer transformações no meio ambiente (AZEVEDO, 1993). O tempo de residência do Hg^0 volatilizado é estimado em dois dias e então é incorporado à circulação atmosférica regional, que ao contato com o oxigênio e ozônio se oxida de Hg^0 para Hg^{2+} . O íon Hg^{2+} por ter alta densidade e solubilidade, retorna ao solo pela precipitação e por lixiviação podendo chegar aos rios e lagos (SILVEIRA et al, 1998). O ciclo é completado pelas rotas de precipitação, transformação pelos microrganismos em formas voláteis ou solúveis, reiteração deste na atmosfera ou bioacumulação na cadeia alimentar aquática ou terrestre (BISINOTI & JARDIM, 2004).

2.5. O PAPEL DO SEDIMENTO NA CICLAGEM DO MERCÚRIO

Os sedimentos são compartimentos ambientais que possuem elevado potencial de acumulação, tanto de substâncias naturais, quanto de natureza antrópica. Quanto mais fino o sedimento maior sua capacidade de reter substâncias químicas principalmente o mercúrio, devido às razões de área e superfície que partículas como argila e siltes possuem. Proporcionando desta forma, uma grande capacidade de interação com íons e moléculas diversas (FRANKLIN, 2010).

Em um estudo desenvolvido por Windmöller et al (2007) em locais de ocorrência de garimpo de ouro com utilização de mercúrio no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais constataram que todo o mercúrio encontrado nas amostras de sedimento estava na forma de Hg^{2+} , e que este se encontrava preferencialmente na fração silte/argila de todas as áreas estudadas. Bisinoti & Jardim (2004) também afirmaram que o mercúrio encontra-se preferencialmente nas partículas de argila.

Segundo o Zoneamento Socioeconômico do Estado de Rondônia - 2002 (ZSEE-RO) os solos mais representativos da bacia do Rio Jamarí (local onde se encontra a área de estudo) são os latossolos que apresentam como principais minerais os derivados da argila, os latossolos vermelho-amarelos e os prozólicos que acumulam argila.

A estratificação do sedimento ao longo do tempo permite que estes sejam vistos como integradores do meio ambiente. Muitas vezes pode-se contar o histórico do local dependendo da estabilidade e deposição das partículas finas do sedimento (MALM et al, 1995).

2.6. O METILMERCÚRIO

A maior fonte de MeHg na alimentação está nos peixes, frutos do mar e derivados, para peixes carnívoros a concentração não deve exceder 0,5 mg/kg de Hg total sendo que, em média, 85 % - 95 % se encontra na forma de metilHg (BISINOTI & JARDIM, 2004; CELO et al, 2006).

Embora o metilmercúrio represente uma parcela muito pequena nos sistemas aquáticos, ele é a forma dominante em organismos superiores, devido ao efeito da biomagnificação (ROSA, et al, 2003).

Em certos rios amazônicos que apresentam uma natureza ácida, pois são ricos em matéria orgânica dissolvida e pobres em nutrientes como o rio Negro, a formação e a disponibilidade de MeHg são maiores, mesmo não havendo fontes próximas de liberação de mercúrio, como os garimpos (ROSA, et al, 2003). As inundações parecem promover a formação e acúmulo de MeHg aumentando consideravelmente a quantidade de MeHg disponíveis para os bentônicos aquáticos e cadeias alimentares terrestres da Amazônia (ROULET et al, 2001).

O mercúrio inorgânico apresenta uma toxicidade relativamente baixa, mas a ação de microrganismos resulta na organificação deste elemento formando metilmercúrio (WASSERMAN, et al, 2001). Os sintomas decorrentes da exposição ao metilmercúrio são principalmente de origem neurológica e consistem em distúrbios visuais, falta de coordenação/locomoção, insensibilidade na pele, perda da audição, dificuldade na articulação das palavras, deterioração mental, tremor muscular, nos casos de exposição grave, paralisia e morte. Verificou-se que certas regiões do cérebro são particularmente sensíveis aos efeitos tóxicos do metilmercúrio como o córtex cerebral (BISINOTI, 2002; BISINOTI & JARDIM, 2004).

A quantificação do metilmercúrio pode ser realizada por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, fluorescência atômica, emissão com plasma induzido, cromatografia gasosa com espectrometria de massas ou absorção atômica com geração de vapor frio. A determinação de mercúrio total não é suficiente para o entendimento da ecotoxicologia deste metal no meio aquático (BISINOTI, 2002). A concentração do metilmercúrio no sedimento de fundo corresponde cerca de 1 a 1,5 % do mercúrio total (BISINOTI, 2002; BOSZKE et al, 2003).

2.6.1. Processos da formação do metilmercúrio no ambiente

Por muito tempo pensou-se que os sedimentos do fundo de rios e lagos fossem os principais locais da formação do metilmercúrio, mas essa reação já havia sido observada em outros tipos de substratos, como o perifíton que crescem em raízes de plantas aquáticas, outras superfícies submersas e também no próprio solo (GUIMARÃES et al, 2000).

Grande parte dos rios amazônicos possuem fatores que favorecem a metilação do mercúrio e a formação do metilmercúrio como baixo pH, grande quantidade de matéria orgânica, baixo potencial redox. Durante o período de águas altas da floresta amazônica, a inundação da floresta fornece material orgânico, ácidos húmicos e flúvicos e Hg junto com os sedimentos argilosos, que formam um ambiente favorável à metilação biótica e abiótica do Hg (COELHO-SOUZA et al, 2007).

A cinética da metilação realizada pelas bactérias em função dos fatores químicos e físicos como temperatura, pH, salinidade, carbono orgânico dissolvido, potencial redox, baixo teor de material particulado favorece a entrada do metilmercúrio na cadeia alimentar dos organismos aquáticos, que são os maiores bioconcentradores deste composto (MAURO et al, 1999; SOUZA & BARBOSA, 2000).

O processo de metilação do mercúrio ocorre principalmente nas camadas superiores do sedimento de fundo. A formação de metilmercúrio é favorecida em condições de pH ácido em torno de 5 a 7, e concentrações de sulfato em torno de 200 a 500 μM podendo variar de acordo com os ambientes em função da temperatura disponibilidade de carbono orgânico dissolvido e porosidade do sedimento (GILMOUR & HENRY, 1991; BOSZKE et al, 2003; SUNDERLAND et al, 2006).

A metilação do mercúrio é favorecida sob condições anaeróbias e dependentes da ação das bactérias sulfato-redutoras (BISINOTI, 2002). Portanto, a metilação do mercúrio é altamente dependente da concentração de sulfato envolvida. Porém, concentrações elevadas de sulfeto, produzido a partir da redução do sulfato, podem interromper a ação das bactérias redutoras de sulfato (GILMOUR et al, 1992; CELO et al, 2006).

Reduções significativas na concentração de MeHg em peixes foram observadas em um estudo realizado em aquário por adição de sulfeto, FeS ou FeS_2 , o que indica que o MeHg deve reagir com o H_2S gerado em sedimentos reduzindo, desta maneira, a quantidade de MeHg disponível para ser acumulado nos peixes (BISINOT & JARDIM, 2004).

Os microrganismos podem metilar ou desmetilar o Hg^{2+} para mercúrio elementar presente nos sedimentos. Ambas as ações são considerados mecanismos de desintoxicação

por parte das bactérias já que o mercúrio elementar tem alta volatilidade (WOOD, 1974; BALDI et al, 1989; GILMOUR & HENRY, 1991).

Baldi et al (1989) fizeram testes com 106 cepas de bactérias aeróbicas isoladas do rio Fiora que drena uma área de depósito de cinábrio na Itália. 37 cepas cresceram no meio ágar contendo uma concentração de 10 µg/mL de HgCl₂, todas elas foram capazes de produzir o mercúrio elementar. Sete das 37 cepas foram capazes de degradar o metilmercúrio para Hg⁰ a partir da concentração de 1,0 µg/mL de metilmercúrio. Desta forma eles concluíram que a metilação do mercúrio não é um mecanismo de resistência ao Hg destas bactérias aeróbicas, e sim um mecanismo de desintoxicação baseado na redução do Hg. Ambas as formas inorgânicas e organomercurial podem ser reduzidas a Hg⁰ voláteis por enzimas específicas de bactérias resistentes ao mercúrio.

O mercúrio inorgânico pode ser metilado em condições aeróbicas e anaeróbicas por dois mecanismos principais: o biológico por microorganismos e fungos, principalmente pela reação com a metilcobalamina, e o químico, ou abiótico, o qual pode ocorrer por três caminhos principais (BISINOTI, 2002):

- **Via metilcobalamina não enzimática** o mercúrio em solução aquosa pode ser metilado abioticamente, tais como: em extratos livres de células de bactérias estritamente anaeróbicas;
- **Via material húmico** o mercúrio inorgânico depositado no solo pode ser metilado abioticamente. Os ácidos fúlvicos e húmicos podem também doar grupos metila para o Hg²⁺ e, portanto, serem uma fonte adicional de metilmercúrio no ecossistema;
- **Via reação de transmetilação** o metilmercúrio pode ser formado quimicamente através de uma reação de transmetilação envolvendo derivados metílicos de estanho. Pode, também, ser produzido quimicamente no sedimento pela reação de transalquilação, entre mercúrio inorgânico e composto etílicos e metílico de chumbo lançados no mesmo corpo d'água.

A metilcobalamina é capaz de transferir o grupo metila para o íon Hg²⁺. Ela transfere o grupo metila como um íon carbânion e um radical metila, para produzir o metilmercúrio e o dimetilmercúrio em condições tanto aeróbicas quanto anaeróbicas (Figura 2). A metilcobalamina pode estar disponível em quantidades significativas no ambiente, porque é uma coenzima produzida pelas bactérias tanto aeróbicas quanto anaeróbicas (BISINOTI, 2002).

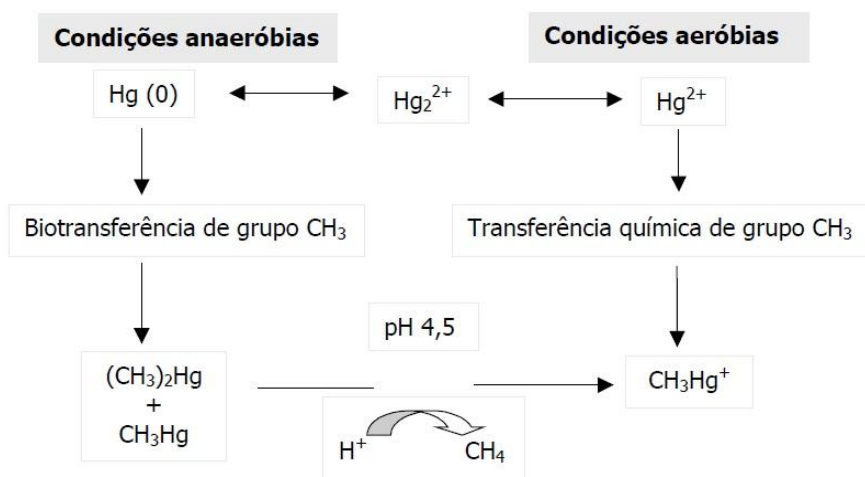


Figura 2 Reações de metilação que ocorrem em ambientes aeróbios e anaeróbios.

Fonte: (BISINOTI, 2002).

A atividade metabólica dos microrganismos desempenha um papel importante na mobilização de elementos tóxicos no ambiente. Os microrganismos são extremamente versáteis na maneira de metabolizar substâncias naturais, e pode-se dizer que se eles não degradarem um composto em particular, é improvável que os organismos superiores terão a capacidade de fazê-lo (WOOD, 1974).

As possibilidades de caminhos alternativos para metabolizar compostos tóxicos facilita a remoção destes, do meio ambiente. Quando confrontados com uma substância tóxica, os microrganismos freqüentemente se adaptam para se desintoxicar. No entanto, a desintoxificação de uma substância por microorganismos pode produzir um produto mais ou menos tóxico para os organismos superiores (WOOD, 1974).

Wood (1984) *apud* Boening (2000) discutiu seis mecanismos de proteção disponível para os microrganismos (e certos organismos superiores) que aumentam sua resistência na presença do mercúrio. Os mecanismos são: I) Bombas de efluxo que removem o íon de mercúrio da célula. II) Redução enzimática do metal à forma elementar menos tóxica. III) Quelação por polímeros enzimáticos. IV) Vinculação do mercúrio à superfície das células. V) Precipitação de complexos inorgânicos insolúveis (normalmente sulfetos e óxidos), na superfície da célula. VI) Biometilação com transporte subsequente por difusão através da membrana celular.

O metilmercúrio é extremamente tóxico para algumas espécies de bactérias. A toxicidade do Hg inorgânico para microrganismos lhes provoca efeitos nocivos em concentrações de 5 $\mu\text{g/L}$, em meio de cultura, e os organomercuriais, em concentrações 10 vezes inferiores (BISINOTI, 2002). Existem ainda bactérias que degradam o metilmercúrio,

mostrando eficiência na limpeza de ambientes poluídos. A biodegradação pode ser efetuada por organismos capazes de utilizar os poluentes para a sua energia e exigências de carbono ou apenas para modificá-lo enzimaticamente sem usá-lo como uma fonte nutricional (BILLEN et al, 1974).

2.7. BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são um grupo de bactéria bastante distribuído na natureza podendo ser encontrado tanto no ambiente aquático quanto no ambiente terrestre, mas ocorrem principalmente em sedimentos, onde as condições redutoras são mais favoráveis. As BRS, podem se apresentar na forma de células esféricas, ovóides, bastonetes ou vibrióides, com diâmetro em torno de 0,3 a 0,4 μm , ocorrendo sozinhas, em pares ou, algumas vezes, em agregados (PATRÍCIO, 2009).

A maioria das BRS são obrigatoriamente anaeróbias, através de um mecanismo respiratório com sulfato como aceptor terminal de elétrons e, conseqüentemente, dando origem a sulfeto como produto metabólico principal. A anaerobiose e exigência de sulfato determinam os ambientes aos quais elas estão ativas, enquanto o sulfeto produzido representa a base do seu impacto ambiental (HAMILTON, 1998).

As bactérias redutoras de sulfato foram descobertas em 1895 por Beijerinck, porem passaram a ser melhores estudadas filogeneticamente e bioquimicamente por Baars em 1930 (POSTGATE, 1979). Elas são classificadas em quatro grupo de acordo com as seqüências do rRNA: BRS mesofílicas gram-negativas; BRS com formação de esporos gram-positivas; BRS termofílicas; e BRS arqueias termofílicas (CASTRO et al, 2000).

Os gêneros mais conhecidos das BRS são: *Desulfovibrio*, *Desulfomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfonema* e *Thermodesulfobacterium* (SOUZA, 2009). Em laboratório as BRS são de difícil cultivo, provavelmente, este fato pode ser atribuído à dificuldade de isolamento e manutenção das culturas puras, pois essas são bactérias anaeróbias e o contato com o oxigênio pode levar á inativação ou inibição de muitas enzimas ou proteínas utilizadas no processo de redução do sulfato (PATRÍCIO, 2009). As principais fontes de carbono utilizadas pelas BRS são o piruvato o lactato, o malato, acetato e etanol como fontes de energia e doadores de elétrons (GIBSON, 1990).

Quanto à temperatura, a maioria das BRS é classificada como mesófila, com um crescimento ótimo entre 25 e 40°C, mas algumas espécies podem tolerar até -5 °C (psicrofílicas), enquanto outras podem apresentar crescimento ótimo em temperaturas

superiores a 75°C (hipertermofílicas). Com relação aos valores de pH, crescem em valor ótimo de 7,2; entretanto, encontram-se espécies que toleram ambientes altamente ácidos (pH 4,0) e alcalinos (pH 9,5). Deve-se destacar ainda a capacidade das BRS suportarem altas pressões, como valores em torno de 105 kPa (espécies barofílicas). Em culturas puras, desenvolvem-se em ambientes em que o potencial de oxi-redução (E_h) esteja abaixo de -100 mV (SOUSA, 2009).

Um grande problema causado pelas BRS nas indústrias de petróleo é a redução dissimilativa do íon sulfato, gerando sulfeto de hidrogênio (H_2S), que é um composto extremamente tóxico e altamente corrosivo. Para combater estes problemas causados pelas BRS, tem-se investido muito dinheiro em produtos químicos como biocidas ou inibidores da formação de biofilme. Porém estas bactérias possuem uma grande capacidade de se adaptar a ambientes hostis e desenvolver mecanismos de proteção a alguns biocidas frequentemente utilizados, o que dificulta o controle de seu crescimento e conseqüentemente os danos causados (ALMEIDA, E.S.C. et al, 2009).

As bactérias redutoras de sulfato representam o principal grupo de microrganismos capazes de metilar o mercúrio. Compeau & Bartha, (1985) realizaram uma série de testes de inibição-estimulação em amostras de sedimento anóxico estuarino, enriquecido com $HgCl_2$. Os testes mostraram que quando as bactérias metanogênicas eram inibidas com 2-Bromoetano-sulfonato (30 mM) a produção de monometilmercúrio aumentava, e quando as bactérias sulfato redutoras eram inibidas com molibdato de sódio (20 mM) ocorria uma diminuição da metilação do mercúrio em 95 %. Estes testes foram os pioneiros em mostrar que as bactérias redutoras de sulfato eram as principais metiladoras de Hg em ambientes naturais.

Jeremiason et al (2006) analisaram as concentrações de MeHg no pântano em uma floresta experimental no Norte de Minnesota (EUA). Antes da primeira adição de sulfato na água, as concentrações de MeHg não foram diferentes entre o controle ($0,47 \pm 0,10 \text{ ng.L}^{-1}$) e os experimentos ($0,52 \pm 0,05 \text{ ng.L}^{-1}$). Duas semanas após a primeira adição, as concentrações de MeHg aumentaram para $1,63 \pm 0,27 \text{ ng.L}^{-1}$ cerca de 3 vezes maior que os controles. Benoit et al (2001) verificaram em seus experimentos com uma cultura pura de *Desulfobulbus propionicus*, que quando aumentava a concentração de sulfeto no sedimento ocorria uma inibição da metilação.

Atualmente outro grupo de microrganismos tem ganhado destaque na metilação do Hg, são as bactérias ferro redutoras. Na Amazônia este grupo tem grande importância devido a grande presença de ferro na região e a afinidade do mercúrio em se ligar aos oxihidróxidos

de ferro e alumínio. Os estudos com as bactérias ferro redutoras se iniciaram com os experimentos de Fleming et al (2006), que isolaram a cepa *Geobacter sp* do Clear Lake (EUA) e está tinha grande capacidade em metilar o Hg em doses comparadas com a BRS *Desulfobulbus propionicus*.

2.7.1. Ferramentas moleculares para o estudo das BRS

Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como Reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica descrita por Saiki et al em 1985, permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinada região do DNA. Como a reação de PCR é específica, pode-se obter a amplificação de seqüências de nucleotídeos-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de seqüências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas (REIS JUNIOR et al, 2002).

A evolução da biologia molecular nas últimas décadas propiciou avanços nos estudos da microbiologia ambiental e da ecologia do solo. A ecologia microbiana molecular é baseada na compreensão das relações entre microrganismos e suas interações com o ambiente, através da análise de moléculas representativas de organismos ou de processos por eles desencadeados (ABOIM et al, 2004). As limitações dos métodos microbiológicos tradicionais, aliadas ao avanço tecnológico na área da biologia molecular, fazem com que as técnicas moleculares sejam, no momento, muito utilizadas para o estudo da diversidade microbiana do ambiente (REIS JUNIOR et al, 2002).

A PCR juntamente com a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) e a PCR em tempo real são métodos de análise microbiológicos eficientes no que diz respeito à sensibilidade e rapidez. Melhoram nossa capacidade de descrever e caracterizar a comunidade microbiana de diversos ambientes que não são favoráveis as tradicionais técnicas de cultivo (KING et al, 2006; CORTEZ, 2009).

A maioria das técnicas moleculares tem carência de um componente quantitativo, que é de grande relevância para o entendimento da estrutura e dinâmica da comunidade microbiana em ambientes naturais (MELO & AZEVEDO, 2008).

A técnica da PCR em tempo real é de grande importância nos estudos de monitoramento das comunidades microbianas, pois permite quantificar concentrações muito baixas de DNA, e também tem grande sensibilidade, rapidez e especificidade na detecção o que não é facilmente conseguido por técnicas clássicas como a PCR convencional (MELO &

AZEVEDO, 2008). Essa técnica foi desenvolvida para caracterizar e quantificar os ácidos nucleicos dos microrganismos em tempo real. A detecção é efetuada por fluorescência produzida por moléculas repórter que emitem fluorescência (MACKAY, 2007).

A técnica do real time PCR tem auxiliado diversos trabalhos que buscam compreender a dinâmica das BRS nos mais variados ambientes como sugerem os trabalhos de Stubner (2004) onde foram analisados os grupos de BRS Desulfovibrionaceae, Desulfobacteraceae e Desulfobulbus sp. em massa de arroz e na rizosfera do solo (previamente enriquecido com um número de células definidas) e constatou que com o passar de três meses o grupo Desulfobacteraceae eram predominantes no local com quantificações de $6,4 \times 10^7$ e $7,5 \times 10^7$ alvos de DNA respectivamente. Nas raízes do arroz os três grupos foram predominantes apresentando quantificações semelhantes com $1,0 \times 10^8$ alvos de DNA indicando desta forma a adaptabilidade destes microrganismos no local.

Schippers & Neretin (2006) avaliaram sedimentos superficiais marinhos no Peru e encontraram quantificações das BRS em torno de 10^6 - 10^8 cópias/cm³ e constataram que ocorria um decaimento exponencial do grupo das BRS nos sedimentos profundos. Ben-Dov et al (2007) avaliaram águas de resíduos industriais na Alemanha e constataram uma maior quantificação das BRS durante o verão com 10^7 - 10^8 alvos de DNA/mL e uma redução no inverno com 10^4 - 10^5 alvos de DNA/mL, os resultados obtidos no PCR em tempo real foram de grande importância segundo os autores pois conseguiram detectar BRS não cultiváveis em laboratório. Spence et al (2008) quantificou uma rica diversidade ainda não descrita de BRS nos esterco suínos demonstrando desta forma que a técnica do PCR em tempo real foi eficiente na detecção destas populações.

O gene 16S rRNA é um gene muito utilizado para a identificação bacteriana. Este gene gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas (REIS JUNIOR et al, 2002). No caso das BRS o gene mais utilizado é o redutase dissimilatória do sulfeto (DSR) visto que é um gene presente em todas as BRS conhecidas e codificam as enzimas de relevância fisiológica e metabólicas que atuam na redução do sulfato para sulfeto, funcionando desta forma como marcadores filogenéticos deste grupo de bactérias ajudando desta forma na investigação de suas relações estruturais e funcionais (NERETIN et al 2003; GEETS et al, 2006; BEN-DOV et al, 2007; SPENCE et al, 2008; MORI et al, 2010).

2.8. O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E A MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

Praticamente, todos os ambientes do planeta encontram-se sob graus variados de contaminação. Assim, a pergunta principal das agências ambientais não é mais se um ambiente está ou não contaminado, mas em que grau ocorre essa contaminação. Metais são contaminantes presentes em efluentes de diferentes atividades antrópicas. A maior parte dos metais, entretanto, apresenta compostos com pouca solubilidade em águas, o que resulta em concentrações baixas mesmo quando da emissão pontual de efluentes. Alguns metais em particular são capazes de apresentar espécies químicas estáveis em solução, o que pode resultar em uma acumulação na coluna d'água atingindo concentrações relativamente elevadas e mesmo tóxica (MALM & LACERDA, 2008).

Desde o século XIX a sociedade se preocupa com os problemas ambientais e, com as consequências do desenvolvimento urbano-industrial. Debates sobre esses assuntos se tornaram mais frequentes com globalização dos meios de comunicação (século xx) permitindo desta forma que informações sobre os impactos provocados pelo desenvolvimento econômico tivesse alcance mundial e que a sociedade iniciasse um processo de tomada de consciência ecológica. Nesse sentido, a percepção de que o desenvolvimento industrial poderia trazer graves problemas à saúde do homem se iniciou com a informação do que estava acontecendo com os pescadores da baía de Minamata, no sul do Japão, em 1950 (DINIZ, 2010).

Hoje, são muito bem conhecidos os efeitos nocivos do mercúrio para a saúde humana e de outros animais este aspecto que vem preocupando a comunidade científica e autoridades brasileiras de saúde e meio ambiente, por conta do uso do mercúrio nos garimpos do ouro e nas fábricas. Emissões globais de mercúrio também são fontes de contaminação. Tal uso precisará ser severamente controlado e vigiado, pois sempre está presente a possibilidade de metilação do metal no meio ambiente e a consequente acumulação de metilmercúrio em cadeias alimentares (AZEVEDO & RAMOS, 1993).

No Brasil, a região amazônica apresenta elevadas concentrações de mercúrio nos peixes e na população ribeirinha, devido não somente ao garimpo de ouro que no passado lançou toneladas deste metal no leito dos rios, mas também à presença de mercúrio natural presente nos solos que com os desmatamentos acaba por ser lixiviado para os rios.

A necessidade em se estudar esses contaminantes ambientais é de fundamental importância para que assim possam se desenvolver técnicas capazes de minimizar os níveis de contaminação. Além dos estudos é necessário que se faça uma conscientização da população, visto que os principais causadores das crises ambientais são os seres humanos (LEFF, 2006).

Sabe-se que o represamento de um rio para a construção de usinas hidrelétricas como é o caso da UHE - Samuel, o processo de metilação do mercúrio pelas bactérias sulfato redutoras é grande devido às condições favoráveis que o ambiente apresenta como anoxia do sedimento, acidez da água e elevadas temperaturas. Grandes empreendimentos hidrelétricos estão sendo construídos atualmente nos rios amazônicos e o estudo de como ocorre a formação do metilmercúrio juntamente com o conhecimento dos microrganismos envolvidos nesse processo é fundamental para levantar informações e servir de apoio para estudos que trabalham diretamente com a população ribeirinha exposta aos perigos do mercúrio.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL:

Buscar entender a dinâmica dos grupos das bactérias redutoras de sulfato (BRS) envolvidas na metilação do mercúrio provenientes de amostras de sedimentos anóxico do Reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel.

3.2. ESPECÍFICOS:

- Realizar o enriquecimento do grupo das bactérias redutoras de sulfato (BRS) presentes em amostras de sedimento do Reservatório Samuel;
- Desenvolver ensaios de metilação do mercúrio em comunidades microbianas provenientes de amostras de sedimento;
- Analisar Hg-T e MeHg nas amostras ambientais e nos ensaios de Metilação do Hg;
- Analisar a produção de MeHg pela técnica do mercúrio radioativo $^{203}\text{HgCl}_2$;
- Avaliar o consumo de sulfato nos meios de cultura pelas BRS, como também verificar a biomassa bacteriana pela técnica dos sólidos totais;
- Quantificar as BRS pela técnica do Real Time PCR;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. EQUIPAMENTOS

- GPS - modelos: GPS GARMIN'S® 48 (diferencial) e GPS GARMIN'S® 12XL Personal navigation™;
- Capela - marca Permution, modelo CE 0702;
- Autoclave - modelo A50, marca Bio Eng.;
- Incubadora – (Shaker) marca Nova Ética, modelo 430/RDBP;
- Microscópio óptico - marca Olympus;
- Balança analítica – marca Marte, modelo AM-220;
- CGAFS – Cromatografia Gasosa Acoplado ao Espectrofotômetro de Fluorescência Atômica – marca Brooks Rand Lab., modelo III;
- Espectrofotômetro de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio FIMS – *Flow Injection Mercury System* – marca Perkin Elmer, modelo 400;
- Mufla – FDG equipamentos 3000;
- Espectrofotômetro de UV Visível – Marca Shimadzu, modelo UV2450;
- Cintilador líquido – Hydex;
- Bloco digestor – marca Tecnal;
- Agitador de tubos – marca Phoenix AP56;
- Lavadora ultra-sônica – marca UNIQUE – Ultra Cleaner;
- Estufa para esterilização e secagem – marca BRASDONCO, modelo 1;
- Centrífuga Thermo Scientific ST 16R;
- Fast Prep™ - FP120 Bio 101Thermo Savant;
- Real Time PCR – 7500 Real Time PCR System AB Applied Biosystems.

4.2. ÁREA DE ESTUDO

O reservatório da UHE Samuel localiza-se a 52 Km da capital Porto Velho (RO) (Nascimento, 2006). O ponto de coleta (Figura 3) está localizado a montante da barragem (estação M05). A escolha deste local de coleta foi devido a estudos pretéritos desenvolvidos nesta região por alunos do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental Wolfgang C. Pfeiffer. A

escolha deste ponto está relacionada ao baixo potencial redóxi, que favorece o crescimento das BRS.

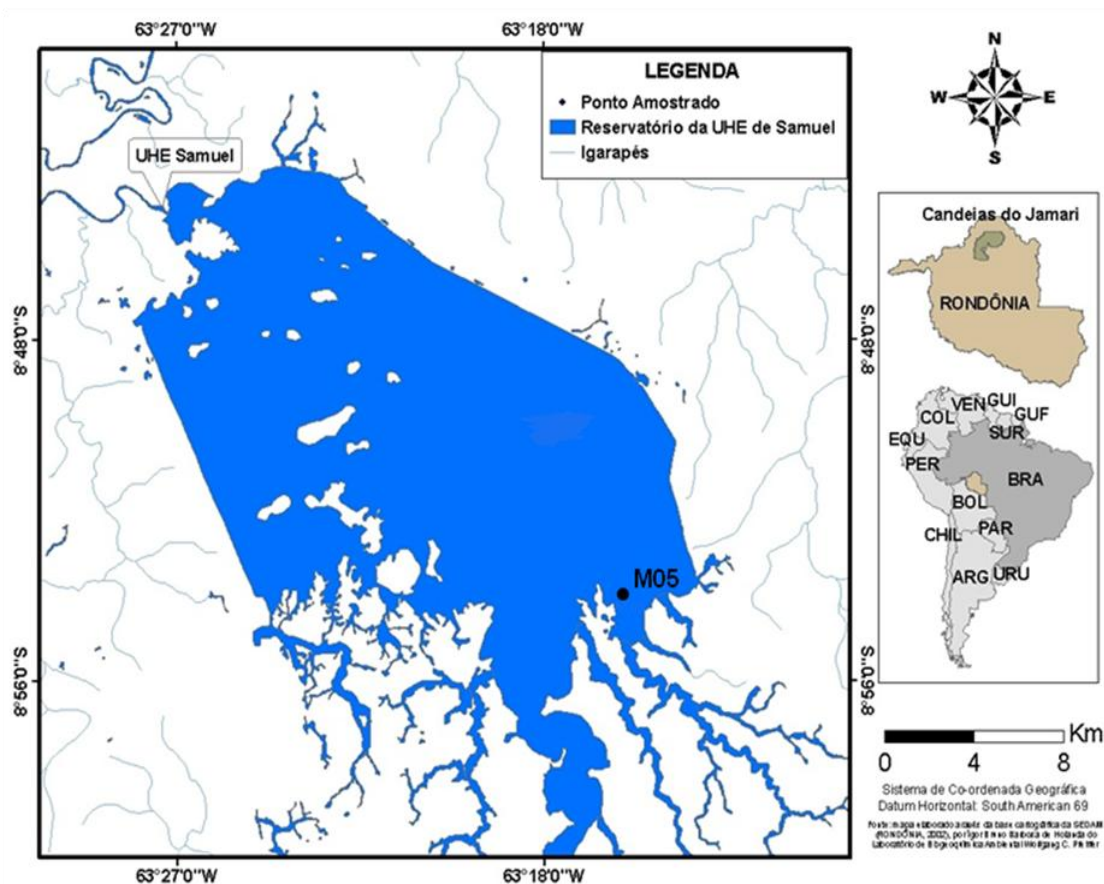


Figura 3. Área de estudo, ponto de coleta M05.

As amostras de água e sedimento foram coletadas no período de águas baixas (Julho/2010) na estação M05 (Figura 4). As amostras de água foram coletadas com o auxílio da garrafa de Van Dorn nas profundidades de 0,2 m, 5 m, 10 m e 15 m. O sedimento foi coletado com a draga de Eckman, estes foram levados para o laboratório e mantidos sob refrigeração. Foram retiradas medidas físico-químicas da água como: temperatura, pH e condutividade. A transparência da água foi estimada através do disco de Secchi. Todas as análises das amostras que se seguem foram desenvolvidas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental Wolfgang C. Pfeiffer da Universidade Federal de Rondônia, com exceção da análise de Real Time PCR que foi desenvolvida no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.



Figura 4. Local de estudo da UHE de Samuel.

4.3. LAVAGEM E DESCONTAMINAÇÃO DAS VIDRARIAS

As vidrarias utilizadas nos procedimentos foram lavadas com *Extram* (Merck) e em seguida imersas em HNO_3 10 %. Após 24 h as mesmas foram enxaguadas em água deionizada e colocadas na estufa para secagem.

O material utilizado para o cultivo das bactérias foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C. As vidrarias utilizadas na análise de MeHg, passaram por uma esterilização maior, após a lavagem com *Extram* elas foram imersas em solução de *Extram* por 24 h, e então colocadas em uma lavadora ultra-sônica, em três seções de 30 min, em seguida enxaguadas com água deionizada e novamente enxaguadas com água MILLI-Q ultra pura (Millipore).

4.4. ATIVAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DAS BACTÉRIAS REDUTORA DE SULFATO (BRS)

O sedimento coletado foi transferido para um frasco reator de vidro de 1L. A ativação e enriquecimento do sedimento seguiram-se os métodos desenvolvidos por Brucha (2007). Foi flucionado gás nitrogênio (N_2 99,99%), mantendo o sedimento em atmosfera anóxica. Uma alíquota de 30 mL deste sedimento foi transferida para dois frascos de reatores de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura Postgate C (Tabela 1), específico para crescimento de BRS, (ILHAN-SUNGUR et al, 2007), sob fluxo de nitrogênio, os quais foram fechados sob esta atmosfera e agitados manualmente para a homogeneização.

No meio de cultura utilizado foi acrescido solução redutora de sulfeto de sódio na concentração final de 5 %. Os procedimentos foram realizados sob condições de assepsia e fluxo constante de nitrogênio. O pH do meio foi medido e ajustado para 7,2 que é um pH ótimo para o crescimento das BRS (ILHAN-SUNGUR et al., 2007; SOUSA, 2009). Os frascos foram incubados sob agitação controlada a 150 rpm, sob temperatura de 30 °C (Figura 4). Os procedimentos para o preparo do meio de cultura Postgate C e para a solução redutora de sulfeto de sódio 5 % estão descritos nos anexos 1 e 2.

Tabela 1. Meio Postgate C (Ilhan-Sungur et al., 2007).

Sais e Reagentes	Quantidades
NH ₄ Cl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ . 6 H ₂ O	0,06 g
Na ₂ SO ₄	4,5 g
MgSO ₄	0,06 g
Lactato de Sódio	6,0 g
Extrato de Levedura	1,0 g
C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ (citrato de sódio)	0,3 g
Solução de resazurina	1,0 ml
FeSO ₄	0,004 g
H ₂ O Milli-Q	1000 ml

A solução de resazurina 0,1 % presente no meio de cultura é uma solução indicadora do potencial de oxidação e redução do meio de cultivo. Quando colocada, o meio fica azul. Ao inserir a solução redutora de sulfeto de sódio 5 % depois de algum tempo fluxionando N₂ o meio tende a ficar amarelo, indicando que está reduzido. Sendo assim, o meio está livre de oxigênio para que as BRS possam crescer e se desenvolver. Caso entre oxigênio, a solução de resazurina faz o meio de cultivo ficar rosa (ILHAN-SUNGUR et al., 2007).

As amostras retiradas no estágio de enriquecimento foram coletadas com o auxílio de seringas de 5 mL, sendo estas esterilizadas no bico de bunsen e mantendo o local e as bocas dos reatores sempre limpas com álcool 70 % a fim de evitar contaminações (Figura 5). Os dois reatores e mais um branco (somente com meio de cultivo), foram incubados por 21 dias. Foi realizado o monitoramento diário dos ensaios. Para isso 3 mL das amostras foram

retiradas para análise de sulfato, segundo metodologia descrita no item.4.9. No primeiro e último dia do enriquecimento foram retirados 8 mL das amostras e armazenados a -4 °C em tubos de polietileno de 14 mL (falcom) para análise molecular dos microrganismos. Foram retiradas também amostras para a análise de sólidos totais voláteis a fim de se verificar a biomassa do crescimento dos microrganismos no meio de cultura, segundo metodologia descrita no Item 4.10.

O cultivo presente no reator 1 mostrou melhor crescimento e melhor desempenho na redução de sulfato que o segundo e, portanto foi armazenado sob refrigeração para ser utilizado nos ensaios de metilação do Hg.

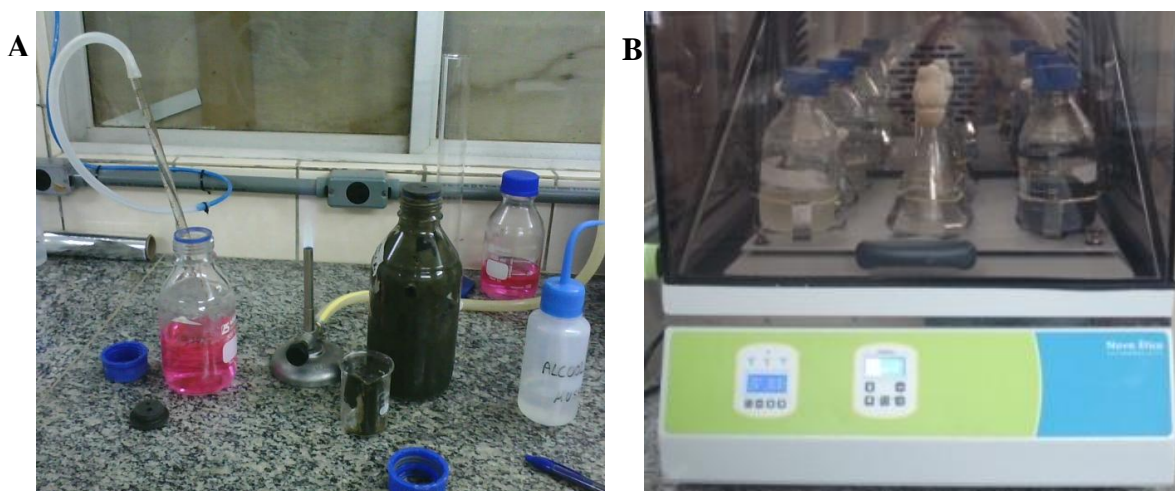


Figura 5. Fluxo de N₂ no meio de cultura (A) e incubação e agitação constante na incubadora (B).

4.5. PRIMEIRO ENSAIO DE METILAÇÃO PELAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

Para os ensaios de metilação o meio de cultura utilizado foi o meio Postgate C com modificações (Tabela 2). Foram retirados os reagentes: MgSO₄ e FeSO₄, pois já estavam presentes na solução traço de metais (descrita adiante). Foram retiradas também as fontes de carbono presentes no meio Postgate C original para evitar a interferência nas fontes de carbono utilizadas para a avaliação da metilação do Hg. O preparo deste meio está descrita no anexo 1 e segue os mesmos princípios do meio Postgate C.

Neste meio foram acrescentados 10 mL da solução traço de metais e 10 mL de uma solução de vitaminas (a descrição do preparo destas duas soluções estão nos anexos 3 e 4) e acrescentados as diferentes fontes de carbono, de modo a avaliar em qual delas seria possível uma maior metilação. As fontes de carbono (Figura 6) e a concentração de Hg utilizadas foram baseadas no trabalho de King et al (2000). Os ensaios com as fontes de carbono foram feitos em réplicas: glicose (denominadas Glicose 1 e 2), acetado de sódio (denominados

Acetato 1 e 2), lactato de sódio (denominado Acetato 1 e 2) e utilizou-se também um composto inibidor para as BRS o molibidato de sódio (denominado Molibidato 1 e 2) segundo Compeau & Bartha (1985).

Tabela 2. Concentração final, massa e volume dos reagentes e soluções usados nos ensaios de metilação.

Componentes	Concentrações finais
NH ₄ Cl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ . 6 H ₂ O	0,06 g
Na ₂ SO ₄	4,5 g
Bicarbonato de sódio 10% (m/v)	0,10%
Solução de vitaminas	10 mL
Solução traço de metais	10 mL
Glicose	10 mM
Acetado de sódio	10 mM
Lactato de Sódio	10 mM
Molibidato de sódio	10 mM
Solução redutora de sulfeto de sódio 5% (m/v)	5%
Inóculo	10%
Cloreto de mercúrio	100 µg/L
Solução de resarzurina	1,0 mL
H ₂ O Milli-Q	1000 mL

As fontes de carbono foram pesadas e dissolvidas em água Milli-Q sob fluxo de N₂. As concentrações estoques do acetato de sódio, lactato de sódio e molibidato de sódio eram de 2 moles/L e da glicose era de 1 mol/L. As soluções foram esterilizadas por filtração em sistema Millipore com membrana de 0,2 µm de diâmetro, e sob assepsia foi distribuída em frascos de antibiótico de 30 mL, sob fluxo de N₂. Os frascos foram fechados com tampas de batoque de butila e lacrados com selo de alumínio. Em seguida foram armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz para uso posterior.

As concentrações finais das fontes de carbono no meio de cultura foram de 10 mM cada, segundo o trabalho de King et al (2000). Os ensaios foram realizados em duplicatas.



Figura 6. Meios de cultura com diferentes fontes de Carbono.

O meio foi reduzido pela adição de 5% de solução de sulfeto de sódio e acrescentado 10 % de inoculo, este inoculo é referente ao reator 1 que obteve melhor desempenho na redução de sulfato durante o processo de enriquecimento, para 150 mL de meio de cultura e acrescentado a concentração final de 100 µg/L de nitrato de mercúrio. Estes foram incubados no “shaker” sob agitação de 150 rpm, sob temperatura de 30 °C. Alíquotas das amostras foram tiradas no tempo de 0, 12, 24 , 48, 72, 96 e 120 horas após o início do experimento, para determinação de MeHg, Hg-T, sulfato e sólidos totais voláteis. Retirou-se também no início e no final do experimento 8 mL de cada uma das amostras para a análise molecular do PCR em tempo real.

Ao final do experimento a comunidade microbiana presente no meio de cultura foi observada por microscopia óptica a fim de se avaliar a morfologia das mesmas. Elas foram coradas pela técnica de coloração de gram (Anexo 5) e verificadas a presenças de bactérias gram positivas ou gram negativas segundo a metodologia descrita por Coelho et al (2006).

4.7. SEGUNDO ENSAIO DE METILAÇÃO PELAS BRS

Foi realizado um segundo ensaio de metilação pelas BRS. Este segundo experimento diferiu-se do primeiro apenas no que diz respeito aos reatores da metilação que foram feitos em quadruplicatas, e as fontes de carbono lactato de sódio e acetato de sódio foram misturadas nas quatro réplicas com concentração final de 10 mM. Estas foram denominadas de: LA1, LA2, LA3 e LA4. Não se utilizou a glicose e também não foram feitos outros testes

com o molibdato de sódio. O intuito deste experimento foi avaliar se a formação de metilmercúrio aumentaria ao juntar as fontes de carbono.

Foram feitos quatro controles sem fontes de carbono e com presença do inoculo denominados de: C1, C2, C3 e C4. Foi utilizado um branco sem fonte de carbono e sem o inoculo para se avaliar possíveis metilações abióticas. Os volumes finais dos reatores foram de 300 mL, com concentração do nitrato de mercúrio de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os frascos foram cobertos com papel alumínio para evitar possíveis fotodegradações (Figura 7).



Figura 7. Reatores da segunda metilação do mercúrio pelas BRS.

Os reatores foram incubados no shaker sob agitação de 150 rpm, à 30°C . Aliquotas das amostras foram retiradas durante oito dias. Os tempos de retirada das amostras para posteriores análises de MeHg, Hg-T, ^{203}Hg e sólidos totais voláteis foram: 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após o início do experimento. Foram retirados também no início e final do experimento 10 mL de amostra para a análise molecular do PCR em tempo real.

4.8. Mercúrio Total (Hg-T)

Foram feitas análises de mercúrio total no sedimento, nos ensaios de enriquecimento e nos dois ensaios de metilação do mercúrio seguindo-se os métodos de Bastos et al (1998). Para a análise de Hg-T no sedimento, este foi liofilizado e então pesou-se 0,5 g de peso seco em tubos de vidro em duplicata. A extração química foi realizada com a adição de 1 mL de água Milli-Q em seguida foi adicionado 4 mL da solução de HCl e HNO_3 3:1. Agitou-se manualmente e então as amostras foram levadas para o bloco digestor a temperatura de 70°C

por 30 min. Esperou-se esfriar e então adicionou-se 5 mL da solução de permanganato de potássio (KMnO_4 5 %). Colocou-se novamente no bloco digestor por mais 20 min. a 70 °C e então após o esfriamento as amostras foram cobertas com plástico filme para evitar contaminação e foram deixadas por 12 horas.

No dia seguinte foi adicionado 1 mL de cloridrato de hidroxilamina 12 % e então as amostras foram filtradas em filtros de papel e funil de plástico em tubos falcon de 14 mL. Os volumes foram aferidos ao valor mais próximo e foi realizada a determinação do Hg por espectrofotometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio (Figura 8). O esquema da Figura 9 demonstra de forma resumida a extração e análise do Hg-T.

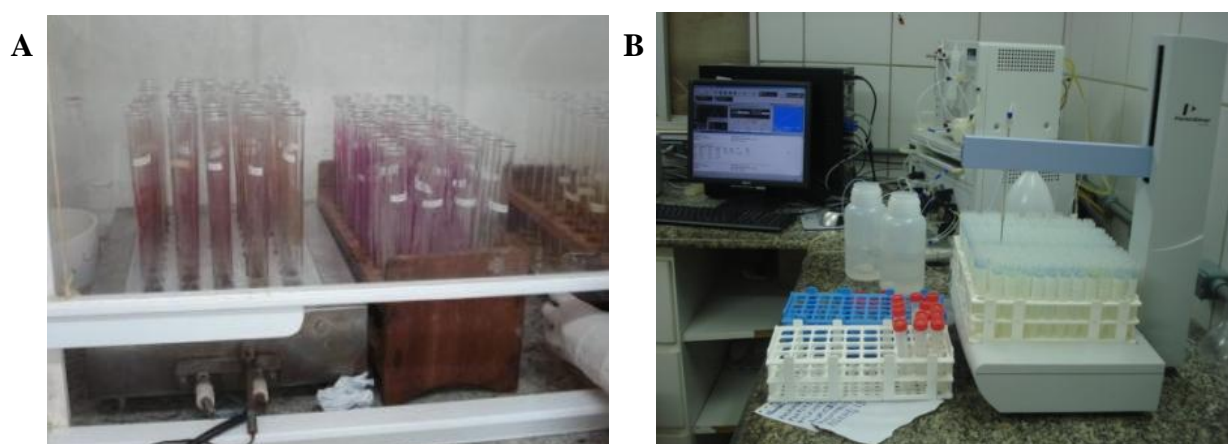


Figura 8. Extração do Hg-T (A). Análise do Hg-T no FIMS (B).

Os ensaios de enriquecimento e metilação sofreram processos diferentes de extração do Hg seguindo a metodologia de Bastos et al (1998). Foram medidos 0,5 mL dos ensaios das BRS em tubos de vidro em duplicatas. Fez-se a extração com 4 mL de HNO_3 e H_2SO_4 1:1. O restante do procedimento ocorreu da mesma forma que para a análise do sedimento, não sendo necessário ao final, filtrar as amostras para então serem avolumadas. A determinação do Hg foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio.

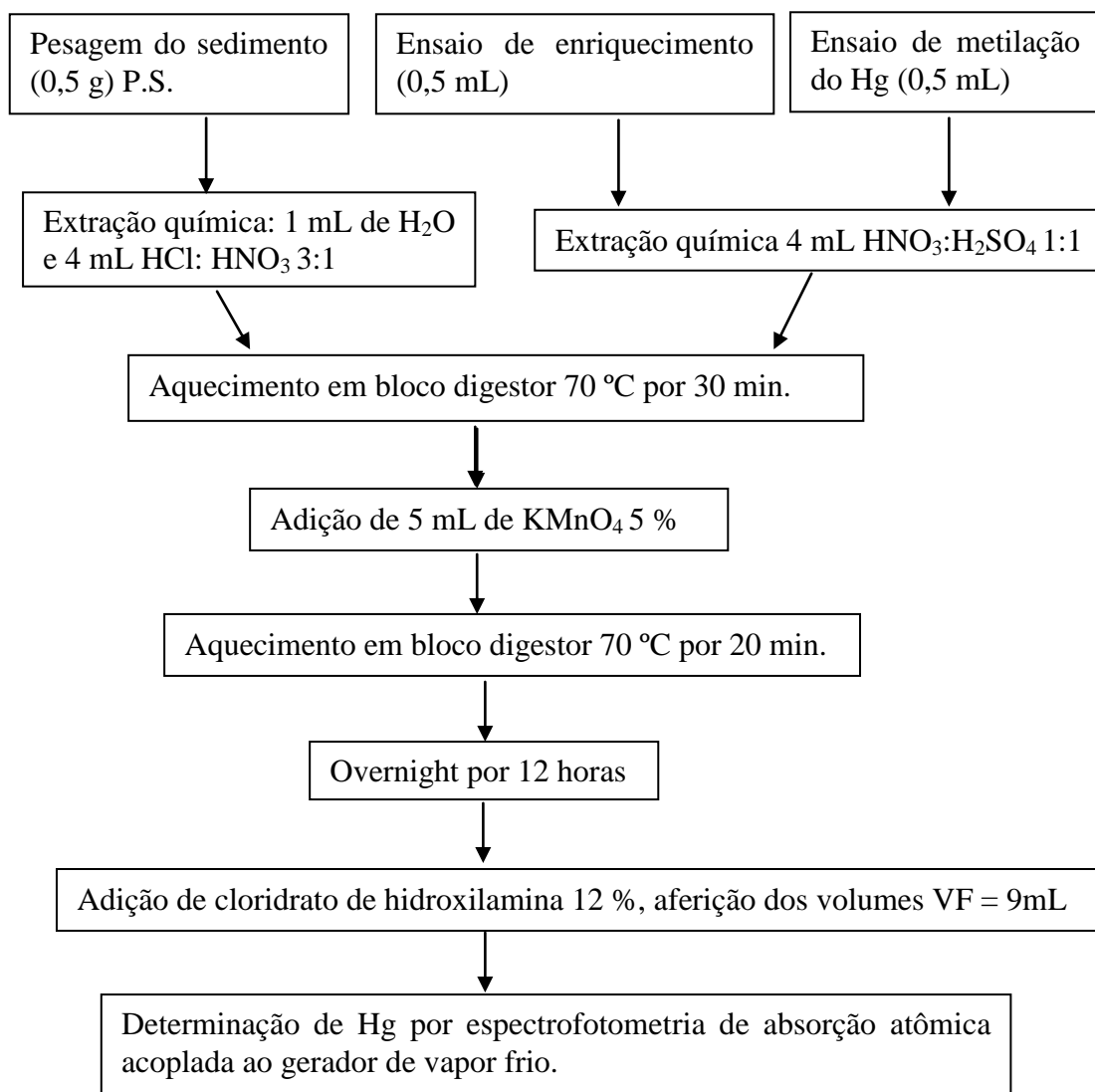


Figura 9. Análise de Hg-T no sedimento e nos ensaios de enriquecimento e metilação (BASTOS et al, 1998).

As amostras foram analisadas em duplicatas e brancos para controle analítico. Para uma maior confiabilidade dos dados foram utilizadas amostras controles certificadas IAEA 405 (National Research Council of Canada: Institute for National Measurement Standards), cuja concentração de mercúrio é $0,57 \text{ mg.Kg}^{-1}$. A calibração do aparelho foi realizada com solução padrão de Hg (solução padrão de 1000 mg.L^{-1} de Hg, Merck S.A.) diluída nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e $40 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Hg.

4.8. ANÁLISE DE MeHg

Foram realizadas as análises de metilmercúrio nas amostras de sedimento, na etapa de enriquecimento e nos dois ensaios de metilação do Hg e nas amostras de água nas profundidades de 0,2 m, 5 m, 10 m e 12 m foi seguida a metodologia EPA 1630 (2001). Durante o processo de extração as amostras sofreram preparos diferentes. O sedimento foi liofilizado e pesado 0,5 g peso seco em tubos de teflon. Para os ensaios bacterianos por serem amostra líquida, foram pipetados 1 mL nos tubos de teflon. A extração do metilmercúrio foi realizada pipetando 5 mL de KOH/Metanol 25 % nas amostras e estas foram para a estufa a 70 °C por 6 horas, sendo estas agitadas a cada 1 hora (Figura 10A). Ao final, as amostras foram armazenadas em local escuro para evitar possíveis degradações do metilmercúrio. A análise foi realizada dois dias após extração, tempo necessário para a estabilidade das amostras.

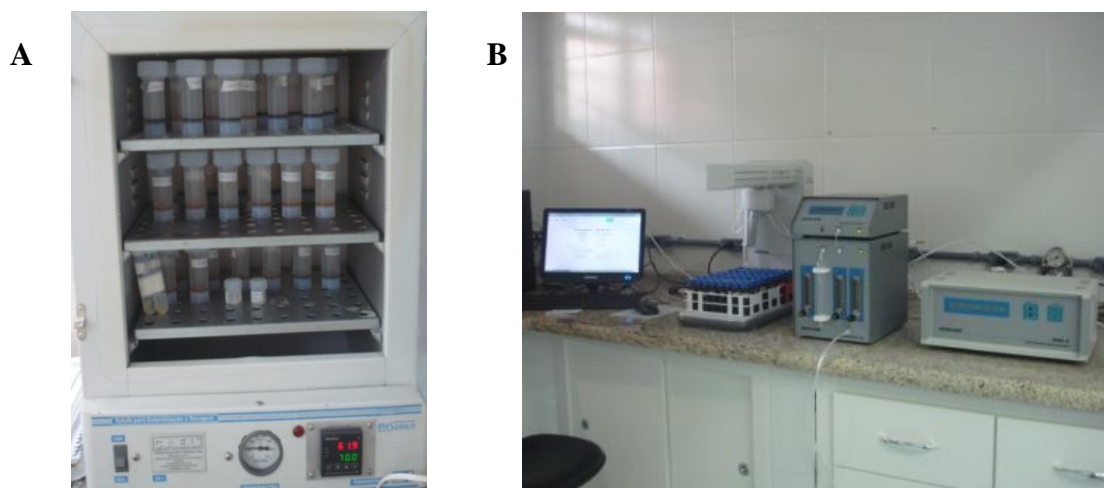


Figura 10. Processo de extração do MeHg (A). E análise das amostras no CG-AFS (B).

Após os dois dias foi realizada a etilação do metilmercúrio, visto que o aparelho faz leitura somente na forma de etilmetilmercúrio. O processo de etilação foi feito com 200 μ L de ácido acético e acetato de sódio (Solução tampão, pH 4,5), seguido de 30 μ L da amostra e 50 μ L de NaBEt_4 1 %. As amostras foram aferidas com água Milli-Q em menisco invertido nos vials de 40 mL próprios para a análise no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrofotômetro de fluorescência atômica (CG-AFS) (Figura 10B).

As amostras de água sofreram processos diferentes para a análise de metilmercúrio. Foram pesados 45 g das amostras de água em tubos de teflon e estas foram destiladas a fim de concentrar o metilmercúrio presente nas amostras. Após pesadas elas foram para o destilador e em cada uma foi colocado solução de APDC 1 % e fechado rapidamente os frascos. A

destilação ocorreu na temperatura de 125 °C por aproximadamente 6 horas. As amostras foram guardadas no escuro e analisadas no dia seguinte. Para o processo de etilação colocou-se as amostras nos frascos âmbar de leitura e pipetou-se 200 µL de ácido acético e acetato de sódio e 50 µL de NaBEt₄ 1 %. Em seguida preencheu os frascos âmbar com a própria amostra formando o menisco invertido. A leitura foi realizada no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrofotômetro de fluorescência atômica. A Figura 11 demonstra de forma resumida o processo de análise do metilmercúrio.

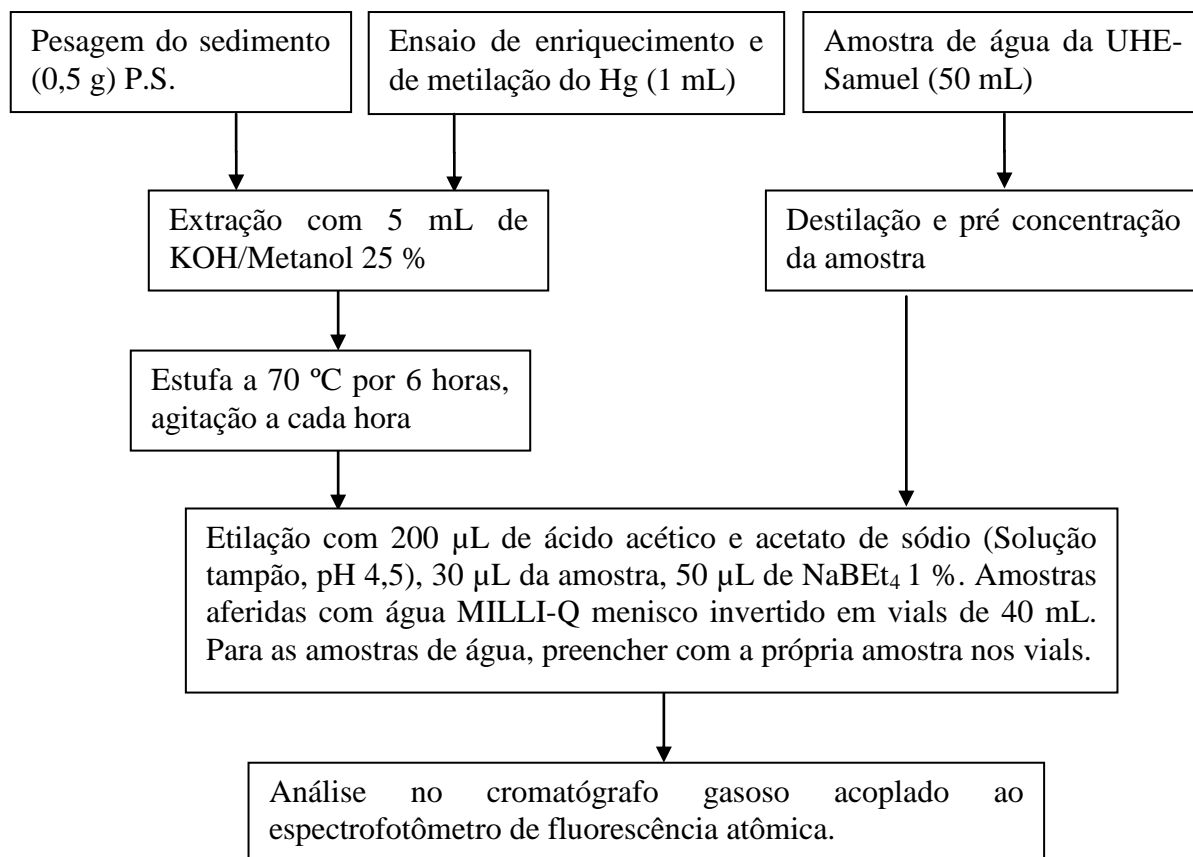


Figura 11. Análise de MeHg nas amostras de sedimento, ensaios microbianos e água (EPA 1630, 2001).

As amostras foram analisadas em duplicatas de leitura. Foi utilizada a amostra certificadas IAEA 405 (obtidas pelo National Research Council of Canada: Institute for National Measurement Standards), cuja, concentração de mercúrio é 0,0054 mg.Kg⁻¹. A calibração do aparelho foi realizada com solução padrão de cloreto de metilmercúrio (solução padrão de 1000 µg.L⁻¹) diluída nas concentrações de 0,5, 1, 2, 10, 50, 250, 1000 ng.L⁻¹ de CH₃HgCl.

4.9. ENSAIO DE METILAÇÃO COM MERCÚRIO RADIOATIVO

Ao final do segundo experimento de metilação restaram 150 mL de amostras nos reatores do tempo de 168 horas, que serviram para que fossem feitos testes com mercúrio radioativo $^{203}\text{HgCl}_2$ afim de se avaliar qual das técnicas de análise seria mais sensível na detecção do MeHg formado. Esse isótopo apresenta meia-vida de 46,6 dias e emite radiações beta e gama, permitindo a sua determinação por espectrometria gama e cintilação líquida (MIRANDA, 2010).

Para o processo de extração e análise do Me ^{203}Hg formado, foram seguidas as técnicas desenvolvidas por Guimarães et al (1995). Foram pipetados 10 μL de $^{203}\text{HgCl}_2$ (100 – 120 nCi; concentração final de Hg 200 ng.L^{-1}) nos 9 reatores (4 controles, 4 reatores com as fontes de carbono e o branco). Estes foram incubados por 5 dias no escuro à temperatura ambiente. A extração do metilmercúrio radioativo foi feita com a adição de 4 mL de brometo de sódio 3 M (dissolvido em ácido sulfúrico 11%) e 1 mL de sulfato de cobre 0,5 M. As amostras foram agitadas manualmente e então foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm. Em seguida foi retirado o sobrenadante e colocado em funis de separação. Foram então adicionados ao funil de separação 15 mL do coquetel de cintilação [composto por 7g de 2,5-difeniloxazol (POP) e 1g 1,4-bis-2(5-feniloxazolil)-benzeno (POPOP) dissolvidos em 1 litro de tolueno].

Os funis foram agitados manualmente por 2 minutos. A fase aquosa foi descartada e 12 mL da fase orgânica foram transferidos para frascos de cintilação de vidro (20 mL). Os frascos foram centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm. Após a centrifugação, a fase orgânica (10 mL) foi transferida para novos frascos de cintilação de vidro (20 mL) previamente preenchidos com 0,3 g de tiosulfato de sódio e agitados manualmente por 10 segundos (Figura 12). O tiosulfato de sódio é um sal altamente higroscópico e tem como função a remoção de partículas de água da fase orgânica que poderiam conter $^{203}\text{HgCl}_2$ (MIRANDA, 2010).

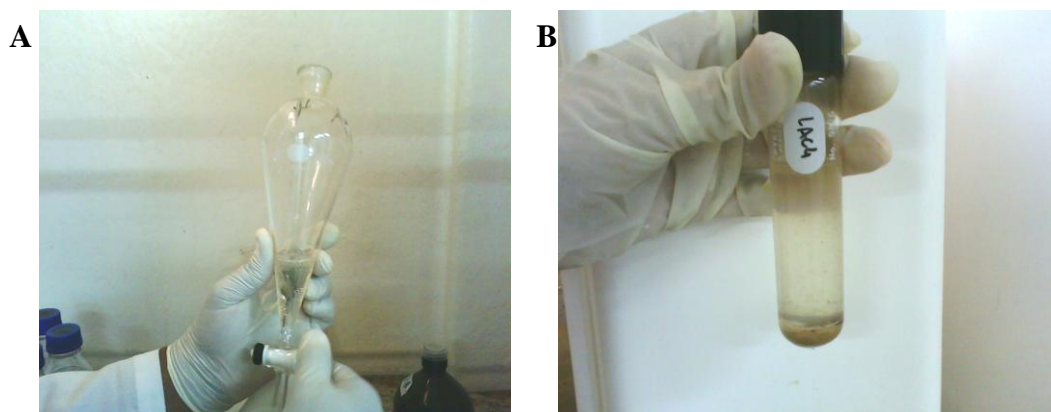


Figura 12. Extração do metilmercúrio radioativo em funil de separação (A) e transferência para frascos de cintilação (B).

A radiação das amostras (expressa em decaimento por minuto, dpm) foi medida em detector de cintilação líquida. Os dados obtidos em dpm foram usados para calcular o percentual do $^{203}\text{MeHg}$ em função da quantidade de $^{203}\text{HgCl}_2$ adicionado. Os resultados foram expressos em %MeHg/g p.s./24h, após a correção do decaimento radioativo, eficiência de extração e extinção (MIRANDA, 2010).

4.10. ANÁLISE DE SULFATO

A determinação da concentração de sulfato em amostra é feita no espectrofotômetro de UV visível através da determinação do comprimento de onda de 420 nm pela suspensão de sulfato de bário em comparação com a curva de calibração. As análises de sulfato foram determinadas na água da UHE-Samuel, na cultura enriquecida, e no primeiro ensaios de metilação, segundo a metodologia descrita por Foresti et al (2005). Utilizou-se 25 mL da amostra de água da UHE-Samuel e 0,5 mL dos ensaios bacterianos, visto que nestes havia concentrações elevadas de sulfato. As amostras foram colocadas em tubos de 50 mL e 14 mL, respectivamente. Foram adicionados 5 mL da solução tampão B (Anexo 6) misturando em agitador de tubos. Em seguida foi adicionada uma colher de cloreto de bário. E as amostras foram agitadas com velocidade constante. A absorbância foi medida em 420 nm no espectrômetro de UV visível.

Para a confecção da curva de calibração preparou-se uma solução padrão de sulfato ($1\text{ mL} = 100\text{ }\mu\text{g SO}_4^{-2}$). Foi dissolvido 0,1479 g de sulfato de sódio anidro em 1000 mL de água deionizada. As concentrações da curva foram de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mg/L. As

concentrações acima de 40 mg/L tornam a precisão reduzida e a suspensão de BaSO₄ diminui a sua estabilidade.

4.11. ANÁLISE DE SÓLIDOS TOTAIS VOLÁTEIS

Para estimar a quantidade de matéria orgânica produzida foi feita a determinação dos sólidos totais voláteis na amostra de sedimento, nos ensaios de enriquecimento e nos dois ensaios de metilação do Hg, seguindo-se a metodologia descrita por Sakamoto & Varesche (2009). Cápsulas vazias foram calcinadas a 450 °C durante 1 hora. Em seguida as cápsulas foram retiradas e deixadas na estufa a 100 °C por 24 horas, estas foram pesadas (P0) e 30 mL das amostras foram colocadas em duplicatas nas capsulas enumeradas. Estas foram para a estufa a 100 °C por 24 horas, pesadas (P1) e em seguida calcinadas a 450 °C por 1 hora. Em seguida as amostras foram pesadas (P2) e feitos os cálculos para a concentração dos sólidos totais, fixos e voláteis.

$$(1) \text{ SST (g/L) sólidos suspensos totais} = (P1 - P0) \times 1000 / \text{Volume da amostra (mL)}$$

$$(2) \text{ SSF (g/L) sólidos suspensos fixos} = (P2 - P0) \times 1000 / \text{Volume da amostra (mL)}$$

$$(3) \text{ STV (g/L) sólidos totais voláteis} = \text{SST} - \text{SSF}$$

4.12. QUANTIFICAÇÃO DAS BRS PELA TÉCNICA DO PCR EM TEMPO REAL

A quantificação do DNA das BRS pela técnica do Real Time PCR foi realizada com o auxílio do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação da Dra. Raquel Peixoto.

As amostras submetidas à quantificação do DNA se referem aos ensaios do segundo experimento de metilação do mercúrio e compreende: 3 réplicas do Controle no início do experimento (tempo 0 horas) e 3 réplicas do controle no final do experimento (tempo 168 horas). 3 réplicas dos meios de cultura com as fontes de carbono acetato de sódio e lactato de sódio (tempo 0 horas) e 3 réplicas dos meios com as fontes de carbono (tempo 168 horas). Foram feitas as quantificações do DNA do sedimento no meio de cultura, do enriquecimento (Reator 1) e do meio de cultura microbiano que deu origem ao ensaio da segunda metilação do Hg pelas BRS. Somando um total de 15 amostras.

Primeiramente as amostras foram filtradas em sistema de filtração com membrana filtrante de 0,22 µm. Os filtros foram cortados ao meio e metade foi armazenada em placas de petri à - 4 °C e a outras foram colocadas em eppendorfs contendo matriz de lise do kit de extração de DNA Power Soil® (MOBIO Laboratories. Inc.). Em seguida, as amostras foram

submetidas ao protocolo de extração de DNA total do solo e água deste mesmo kit. O protocolo de extração pode ser visualizado no anexo 5.

O DNA total microbiano extraído foi quantificado no aparelho Quibit® fluorometer invitrogen™. Os valores de DNA acima de 1 ng/μL foram diluídas para a análise no Real Time PCR.

A quantificação do DNA das bactérias redutoras de sulfato pela técnica do Real Time PCR foi realizada utilizando o par de iniciadores Dsr1F [5' – ACSCACTGGAAGCACGGCGG– 3'] e Dsr4R [5' – GTGGMRCCTGTGCAKRTTGG– 3'] segundo Kondo et al (2004) que são os genes específicos para as BRS.

A reação da amplificação foi feita em placa de polipropileno (96 poços) com um volume final de 25 μL contendo 12,5 μL de GoTaqPromega Master Mix 2X (Promega®), 0,5 μL de cada iniciador, 0,5 μL de BSA (1mg/mL), 9 μL de H₂O própria para PCR e 2 μL de DNA segundo os métodos de Spence et al (2008). Esta placa foi centrifugada a 14000 rpm para misturar todos os reagentes. Todas as amplificações foram realizadas em triplicatas e a análise foi feita no sistema de detecção ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). A reação e análise podem ser visualizadas na Figura 13.

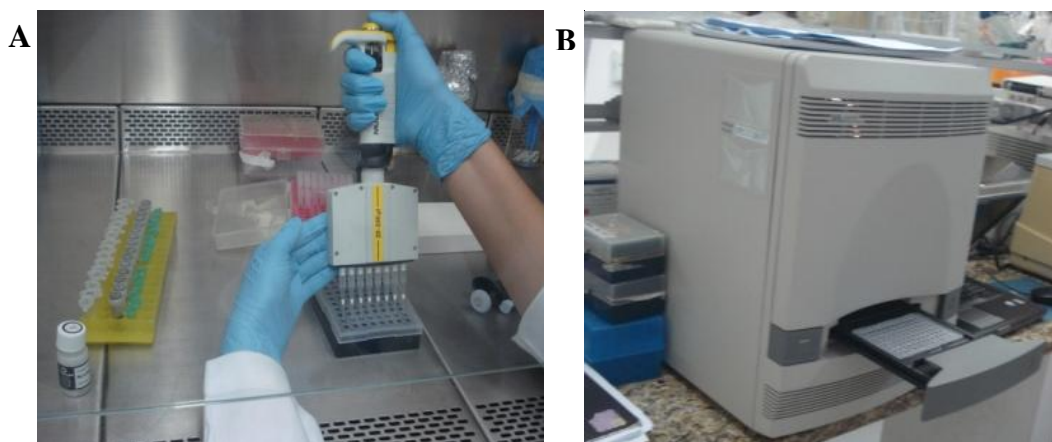


Figura 13. Reação da amplificação do DNA das BRS (A). Análise no Real Time PCR (B).

Foram incluídas amostras de DNA-padrão para a construção da curva de calibração e água como controle negativo. As condições de PCR foram 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 45 seg. Foi obtida uma curva de desnaturação para todas as reações pelo aquecimento dos produtos a 95 °C, resfriamento a 65 °C e então aquecimento gradual até 95 °C numa taxa de 0,2 °C por segundo. A especificidade dos produtos gerados pela reação em tempo real foi confirmada através da análise da curva de desnaturação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AMOSTRAS AMBIENTAIS DA UHE-SAMUEL

5.1.1. Parâmetros físico-químicos

Dentre os parâmetros físico-químicos o potencial redox está entre os mais importantes para se encontrar as BRS. Segundo Sousa (2009) as BRS se desenvolvem bem em temperaturas de 25 °C a 40 °C, em pH em torno de 7 e um potencial redox -100 mV.

Korthals e Winfrey (1987 *apud* Bisinoti 2002) demonstraram que a temperatura e as condições redox são fatores que influenciam muito a metilação, sendo que a temperatura é responsável por 30% desta variação, pois o aumento na temperatura causa um aumento na atividade microbiana.

Os valores encontrados na coluna d'água do ponto de coleta M05 da UHE-Samuel (Tabela 3), durante o período de coleta do sedimento, favorecem a presença das BRS, sendo o potencial de óxido redução (ORP) encontrado próximo ao sedimento de -138 mV.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da coluna d'água do ponto de coleta M05.

Profundidade (m)	pH	OD (mg.L ⁻¹)	TDS (ng/L)	Cond. (mS.Cm ²)	Temp. (°C)	ORP (mV)	Secchi (m)
0,2	6,51	7,3	0,021	31,0	30,3	245	3,00
2	6,52	7,3	0,021	32,0	30,0	253	
4	6,48	6,93	0,020	31,0	29,7	264	
5	6,38	6,53	0,020	31,0	29,6	272	
7	6,21	5,32	0,020	30,0	29,5	281	
9	5,96	2,02	0,018	27,0	28,7	285	
10	5,79	1,1	0,017	26,0	28,7	276	
12	6,60	0,78	0,020	32,0	28,1	-63	
14	6,69	0,7	0,021	33,0	27,7	-99	
15	6,70	0,64	0,022	35,0	27,4	-117	
17	6,72	0,57	0,025	39,0	27,0	-138	

Analisando de forma individual cada um dos parâmetros através da ferramenta de correlação realizadas no software STATISTICA 7.0 adotando-se como variável dependente a profundidade e como variável independente os parâmetros físico-químicos. Podemos perceber a existência de correlação negativa forte entre profundidade e oxigênio dissolvido (OD) de -0,9369; profundidade e temperatura de -0,9896; profundidade e potencial de óxido redução

de -0,8246, como demonstrado nas Figuras 14, 15 e 16. Os demais parâmetros apresentaram correlação fraca.

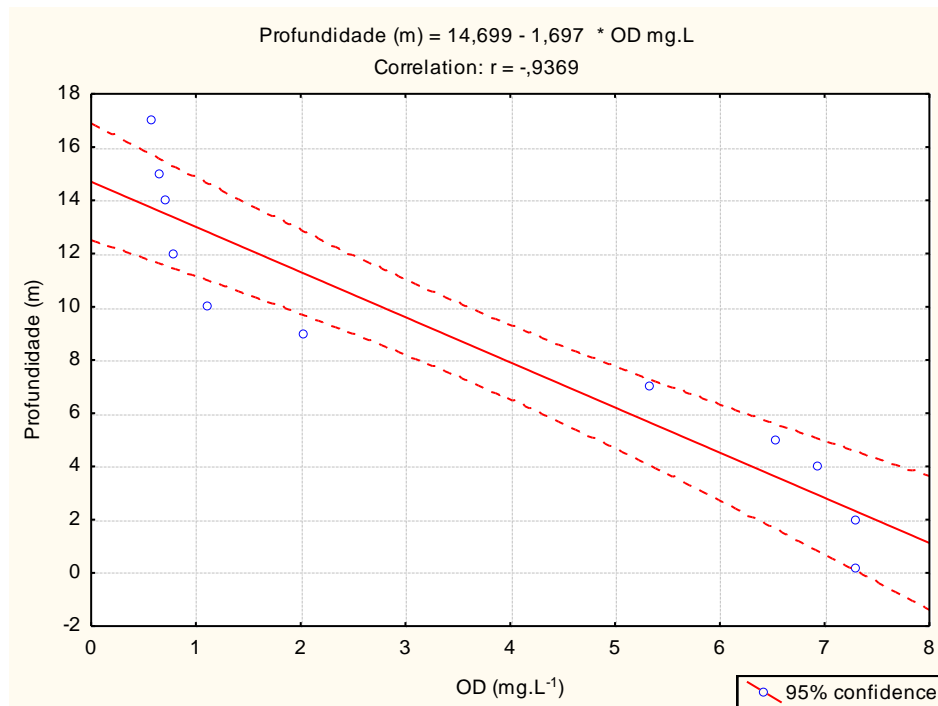


Figura 14. Intensidade da correlação entre oxigênio dissolvido e profundidade.

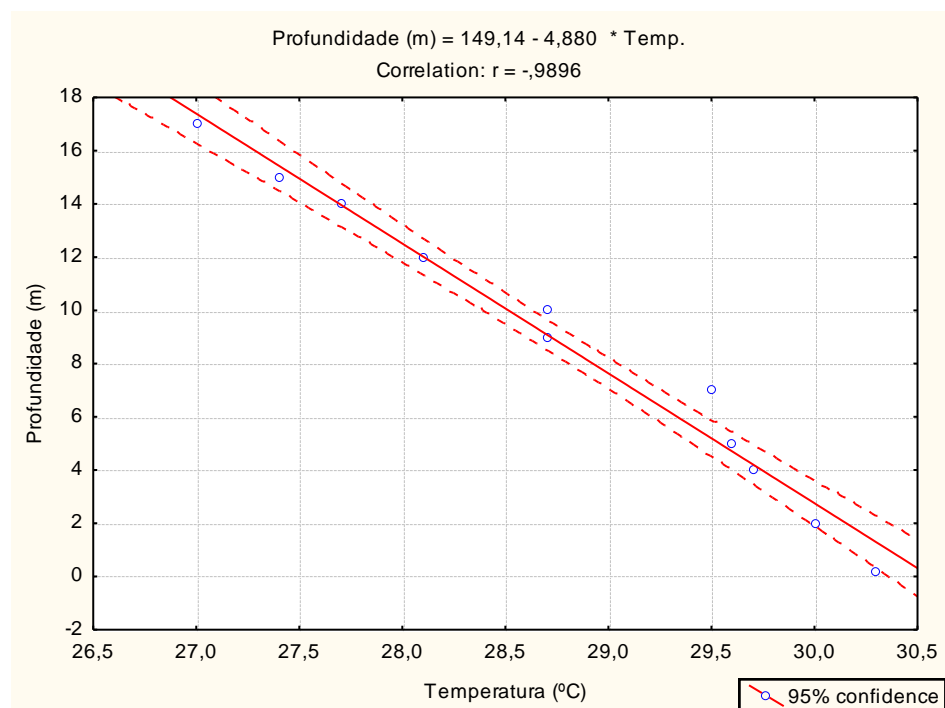


Figura 15. Intensidade da correlação entre temperatura e profundidade.

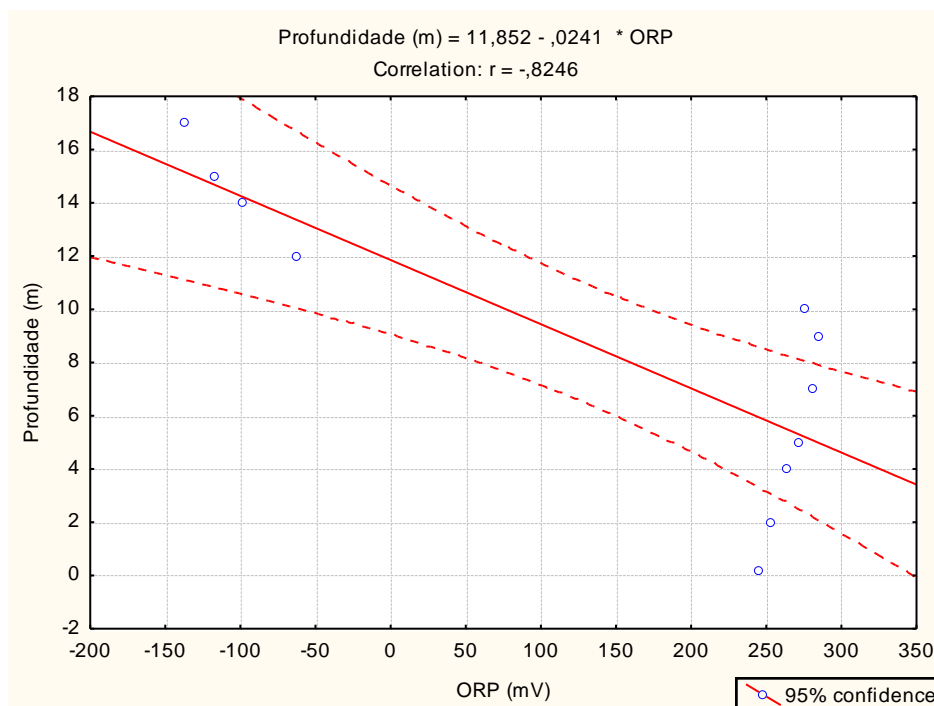


Figura 16. Intensidade da correlação entre potencial de óxido redução e profundidade.

Estes resultados podem influir na estratificação da coluna d'água dentro de um reservatório como é o caso da U.H.E - Samuel. Assunto este já debatido por vários autores (FEARNSIDE, 2005; MALM & LACERDA, 2008) que afirmam que o represamento de um rio pode causar a estratificação e o favorecimento da metilação do mercúrio.

Nascimento (2006) encontrou as mesmas condições físico-químicas no reservatório de Samuel em dois anos de estudo com algumas pequenas variações sazonais que ocorrem nesta região. Outros autores também encontraram condições físico-químicas similares ao deste estudo em ecossistemas de manguezais amazônicos no nordeste do estado do Pará (BERRÊDO, et al 2008) e em afluentes do rio Madeira no estado de Rondônia (MIRANDA, 2010), demonstrando desta forma que os ambientes amazônicos são propícios para que a metilação do Hg ocorra.

5.1.2 Avaliação do sulfato

As concentrações de sulfato na água encontradas no ponto de coleta da UHE - Samuel estão demonstradas na Tabela 4 e os dados estão plotados na figura 17 correlacionando a concentração de sulfato e a profundidade. A curva de calibração da análise de sulfato apresentou um R^2 de 0,9996.

Kerry, et al (1991) encontrou concentrações de sulfato na superfície da água (entre 6 a 8 mg.L⁻¹) similares ao deste estudo no lago Muskoka-Haliburton em Ontário no Canadá.

Tabela 4. Concentrações de sulfato nas amostras de água da UHE - Samuel.

Profundidade (m)	Concentração de sulfato (mg.L ⁻¹)
0,2	7,826
5	8,335
10	9,084
15	8,527

A relação entre sulfato e profundidade apresentou uma correlação positiva forte, desta forma podemos ver que quanto maior a profundidade maior a concentração de sulfato que pode ser utilizado pelas BRS, que vivem em ambiente anóxico no sedimento, como acceptor de elétrons na respiração.

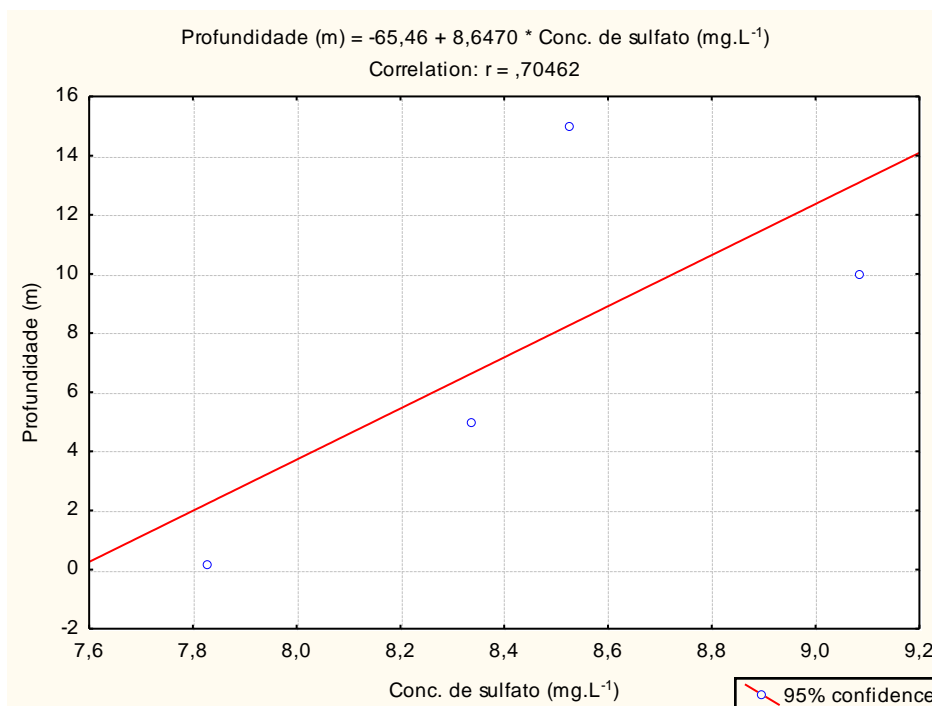


Figura 17. Intensidade da correlação entre concentração de sulfato e profundidade.

5.1.3 Sólidos totais voláteis

As concentrações dos sólidos totais voláteis (STV) encontradas no sedimento foram de STV=36044 mg/L, porem este valor encontrado para o sedimento não é representativo somente para biomassa bacteriana, visto que no sedimento existem diversos outros compostos como matéria orgânica, silte, argila.

Os sólidos totais têm sido amplamente estudados em regiões impactados por resíduos industriais e domésticos. Altos valores de sólidos totais voláteis (288,73 g/L) no sedimento do estuário de Santos na área de influência da Companhia Siderúrgica de São Paulo - COSIPA foram observados por Brucha (2007). Leite & Povinelli (1999), estudaram processo de digestão anaeróbia à fração orgânica putrescível dos resíduos sólidos urbanos, tomando como parâmetros avaliativos os sólidos totais e os sólidos totais voláteis na cidade de São Carlos-SP. Observaram que a concentração de sólidos totais sofreu rápida redução de até 93 % contribuindo desta forma para o melhoramento do meio ambiente.

Neste trabalho as concentrações dos sólidos totais voláteis foram utilizadas como medida para avaliar o crescimento microbiano nos ensaios de metilação e os sólidos totais para relacionar a concentração de metilmercúrio produzido pela biomassa microbiana nos reatores dos meios de cultura no final dos experimentos.

5.1.4. Resultados do Hg-T e MeHg

5.1.4.1 Sedimento e água

Os valores encontrados de MeHg das amostras ambientais de água da UHE – Samuel e o trabalho de outros autores que estudaram o MeHg em água estão listados na Tabela 5. Os valores da literatura são similares aos resultados encontrados com exceção da profundidade de 15 m que apresentou um alto valor de MeHg, caracterizando desta forma que o fundo do reservatório onde a atividade bacteriana é mais intensa, a concentração de MeHg é maior.

Tabela 5. Valores de metilmercúrio presentes nas amostras de água da UHE - Samuel e outros trabalhos.

Localização	MeHg (ng.L ⁻¹)	Referência
UHE-Samuel (0,2 metros)	0,016±0,009	Deste estudo
UHE-Samuel (5 metros)	0,017±0,009	Deste estudo
UHE-Samuel (10 metros)	0,043±0,008	Deste estudo
UHE-Samuel (15 metros)	0,312±0,028	Deste estudo
Rio Tapajós	0,02 a 0,04	Roulet, et al (2000)
Peti Salt- Guiana Francesa (seca)	0,023±0,011	Coquery, et al (2003)
Peti Salt- Guiana Francesa (cheia)	0,025±0,014	Coquery, et al (2003)
Lago Muskoka – Ontário Canadá	1,8	Kerry, et al (1991)
Rio Tahquamenon - EUA	0,1 a 0,4	Stoor et al (2006)
Rio Madeira (águas altas)	0,256 a 0,307	Bastos et al (2011)
Rio Madeira (águas baixas)	0,017 a 0,044	Bastos et al (2011)

As concentrações de MeHg na água da UHE-Samuel foram relacionadas com a profundidade (Figura 18) e encontrou-se uma correlação positiva forte entre concentração de metilmercúrio e a profundidade $R = 0,823$. Podemos perceber que quanto maior a profundidade maior a concentração de metilmercúrio. O mesmo fato aconteceu com o sulfato, porém quando relacionamos a concentração de sulfato com o MeHg, não ocorreu nenhuma correlação entre as análises.

As concentrações de Hg e de metilmercúrio na água de rios e lagos são muito baixas, visto que quando o mercúrio entra na coluna d'água ele se adere às partículas em suspensão ou a qualquer outro substrato presente no rio, não ficando, portanto muito tempo disponível na água. Os valores de metilmercúrio encontrados no reservatório da UHE – Samuel na água é abaixo da legislação (CONAMA nº 357), como era o esperado.

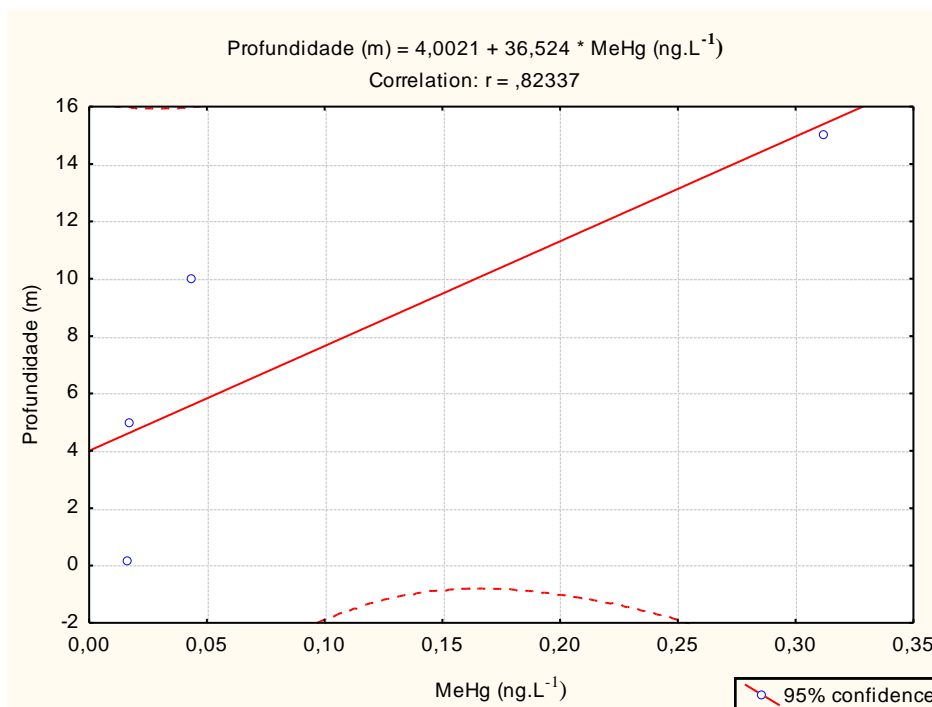


Figura 18. Intensidade da correlação entre concentração de MeHg e profundidade no reservatório de Samuel.

O resultado de mercúrio total encontrado no sedimento foi de $141,45 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. Para metilmercúrio o valor encontrado foi de $0,49 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. Com relação ao metilmercúrio 0,34 % do mercúrio encontrado no local de coleta do reservatório de Samuel está na forma de MeHg. Esse dado é importante para explicar a porcentagem de metilmercúrio formado durante os ensaios de metilação que atingiram a produção máxima de 0,35 % de MeHg utilizando as fontes de carbono lactato/acetato. Pfeiffer et al (1989) encontrou valores semelhantes de Hg total no sedimento (50 a $280 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) em áreas onde ocorriam garimpos de ouro no rio Madeira. Outros estudos mais recentes de Hg total no sedimento do rio Madeira foram

realizados por Bastos et al (2006) onde encontrou concentração média de 46,21 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e Bastos et al (2011) onde encontrou concentrações de 13 a 144 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

A concentração de metilmercúrio por grama de biomassa bacteriana (peso seco) no sedimento foi de 2,87 ng.g^{-1} . Gilmour et al (1992) encontrou concentrações de metilmercúrio no sedimento de 0,03 a 0,37 ng.g^{-1} no reservatório de Quabbin nos Estados Unidos. Kerry et al (1991) encontrou concentrações similares ao deste estudo (2,50 ng.g^{-1}) no lago Muskoka-Haliburton em Ontário no Canadá.

5.2. ENRIQUECIMENTO

Nos ensaios de enriquecimento a concentração inicial de sulfato de sódio presente nos meios de cultura era de 4500 mg.L^{-1} . A porcentagem de sulfato consumido durante os vinte e um dias de experimento foi em torno de 9 %. A concentração média final do experimento ficou em 4108 mg.L^{-1} .

Oliveira (2007) verificou um consumo de sulfato de 31,2% pelas BRS em tratamentos de efluentes e verificou que, nas condições experimentais testadas, o melhor resultado obtido para remoção dos interferentes dos efluentes estudados foi alcançado nos ensaios onde culturas de BRS foram usadas como agente biológico, e esgoto como fonte de carbono.

O crescimento bacteriano durante o ensaio de enriquecimento obteve um valor referente aos sólidos totais voláteis (STV) de 5620,00 mg.L^{-1} . O que indica um bom crescimento e adaptação às novas condições laboratoriais.

5.3. ENSAIOS DA METILAÇÃO DO Hg PELAS BRS

A determinação de sulfato para o primeiro ensaio de metilação pelas BRS sofreu problemas de diluição e, portanto as amostras foram perdidas. Não foram feitas análises de sulfato para o segundo ensaio de metilação.

O acompanhamento do crescimento da biomassa microbiana nos ensaios de metilação foram realizados pela determinação dos sólidos totais voláteis (Figura 19). O primeiro ensaio durou 5 dias e o segundo durou 8 dias. Para o primeiro experimento com as fontes de carbono analisadas separadamente, o ensaio que obteve um melhor crescimento foi a glicose com 905 mg.L^{-1} , seguido do lactato com 710 mg.L^{-1} , depois o molibidato com 697 mg.L^{-1} , o controle sem a fonte de carbono com 670 mg.L^{-1} , e o acetato com 475 mg.L^{-1} . O segundo experimento onde as fontes de carbono lactato e acetato foram misturadas, o crescimento foi

de 628 mg.L^{-1} , e o controle obteve um crescimento de 527 mg.L^{-1} . Todas as culturas mostraram um bom desenvolvimento e, portanto maior biomassa bacteriana, mesmo estando estas culturas sob estresse, devido a concentração alta de Hg (100 ppb) colocada no meio de cultura.

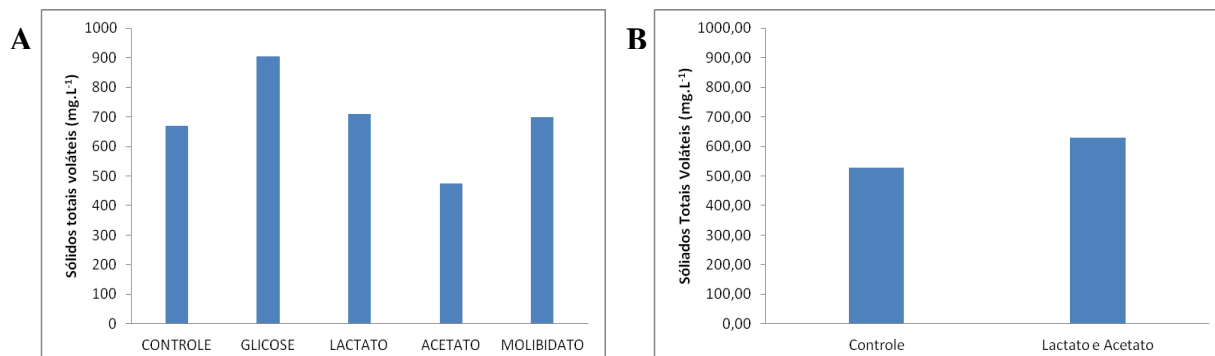


Figura 19. Concentração dos sólidos totais voláteis (STV). Primeiro ensaio de metilação (A) e segundo ensaio de metilação (B).

Com relação aos ensaios de metilação pelas BRS, os valores de sólidos totais obtidos foram utilizados para calcular a concentração de metilmercúrio por grama de biomassa bacteriana (peso seco). Os resultados são referentes ao final dos experimentos (1º ensaio de metilação 120 horas e 2º ensaio de metilação 168 horas). As concentrações finais de metilmercúrio no primeiro experimento (Figura 20) diferiram entre as próprias réplicas dos reatores, indicando a imprevisibilidade do comportamento das bactérias e as dificuldades em se trabalhar com estes microrganismos. Também podemos levar em consideração possíveis perdas de mercúrio por volatilização durante o processo de incubação destes microrganismos ou até mesmo por redução deste mercúrio à sua forma elementar como sugeriu o trabalho desenvolvido por Baldi et al (1989) onde das 106 cepas bacterianas isoladas 37 delas foram capazes de produzir Hg^0 volátil a partir de uma concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ de HgCl_2 .

As médias das concentrações de metilmercúrio nesse primeiro experimento acompanharam os resultados obtidos no crescimento microbiano pela técnica dos sólidos totais voláteis (STV). Com exceção do controle que obteve a maior concentração na produção do MeHg (56 ng.g^{-1} de peso seco bacteriano), as fontes de carbono seguiram o mesmo princípios do STV. A glicose com a maior concentração de MeHg $49,90 \text{ ng.g}^{-1}$ de peso seco bacteriano com uma taxa final de metilação de 0,34 %, seguido do lactato com $44,84 \text{ ng.g}^{-1}$ de peso seco bacteriano com uma taxa final de metilação de 0,33 %. Em seguida do molibdato com $23,34 \text{ ng.g}^{-1}$ de peso seco bacteriano com uma taxa final de metilação de 0,26 %, e por último o acetato de sódio com $21,79 \text{ ng.g}^{-1}$ de peso seco bacteriano com uma taxa final de metilação de 0,21 %. A taxa de metilação foi calculada a partir dos resultados

obtidos na análise de MeHg dividindo pelo valor encontrado na análise de Hg-T e multiplicando por 100. O branco obteve uma média de MeHg de 2,32 ng.g^{-1} de peso seco bacteriano.

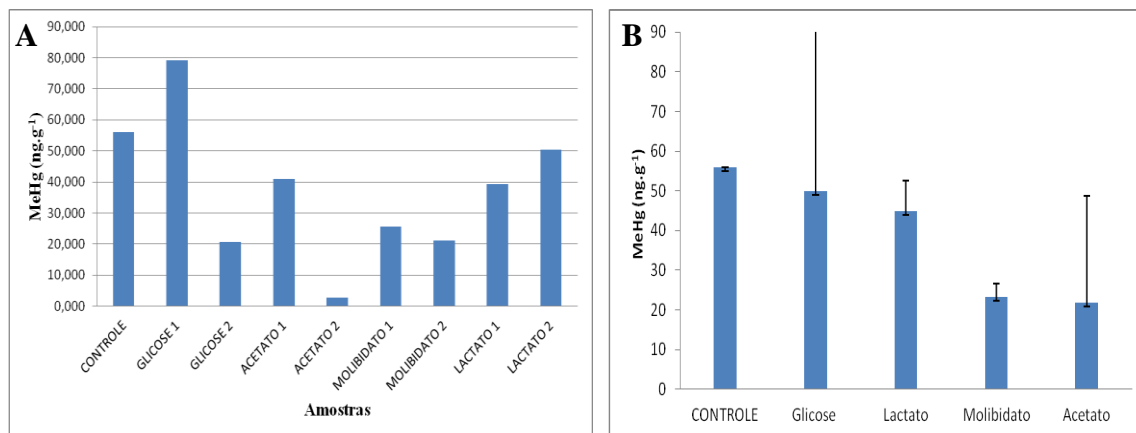


Figura 20. Primeiro ensaio de metilação pelas BRS, tempo de 120 horas. Concentrações entre cada réplica (A) e média final entre as réplicas (B).

Analizando o ensaio com molibdato, percebemos que no primeiro ensaio de metilação a concentração de 10 mM de molibdato não foi suficiente para inibir a total metilação do mercúrio como ocorreu nos estudos de Compeau & Barta (1985). Achá et al (2010) utilizaram uma concentração de molibdato de sódio de 5 mM em experimentos com o perifiton para inibir a ação das BRS em um lago da amazônia boliviana e encontrou inibição parcial da metilação do mercúrio e sugeriu que poderiam estar havendo a influencia de outros microrganismos metiladores. Kerry et al (1991) conseguiram inibição da produção do metilmercúrio com 5 mM de molibdato de sódio.

Os resultados do primeiro ensaio de metilação pelas BRS serviu de base para se fazer o segundo experimento de modo a aprimorá-lo. Duas fontes de carbono (lactato e acetato) foram selecionadas para entrar no segundo ensaio devido o fato de serem muito utilizadas por diversos autores como doadoras de eletrons para a redução do sulfato pelas BRS (COMPEAU & BARTA 1985; GIBSON, 1990; PARK & BARTHA, 1998; KING et al, 2000).

Para o segundo ensaio de metilação (Figura 21), foram tomados cuidados maiores para evitar degradações abióticas do mercúrio. A média das concentrações entre os controles, sem fonte de carbono, foi de 44,87 ng.g^{-1} de peso seco bacteriano com uma taxa final de metilação de 0,28 %. Para o lactato/acetato a média das concentrações foi de 51,73 ng.g^{-1} de peso seco bacteriano com uma taxa final de metilação de 0,35 %. Os ensaios com fonte de carbono apresentaram concentrações um pouco maiores como era o esperado, visto que a função destas fontes é doar elétrons e ativar ainda mais a atividade bacteriana. A quantidade de

biomassa microbiana (STV) nesse 2º ensaio de metilação também foi correspondente com quantidade de MeHg produzida. A concentração do branco foi de $6,24 \text{ ng.g}^{-1}$.

Os controles, sem fonte de carbono, em ambos os experimentos mostraram metilação do mercúrio. Achá et al (2010) encontraram uma produção de metilmercúrio em seu controle de $0,164 \text{ ng.g}^{-1}$ em 12 h. O restante de suas amostras contendo fontes de carbono encontrou uma metilação de $1,104 \text{ ng.g}^{-1}$ em 12 h e relacionou esses resultados com a importância da variabilidade e complexidade das interações microbianas com a produção do metilmercúrio e suas respostas aos estímulos externos.

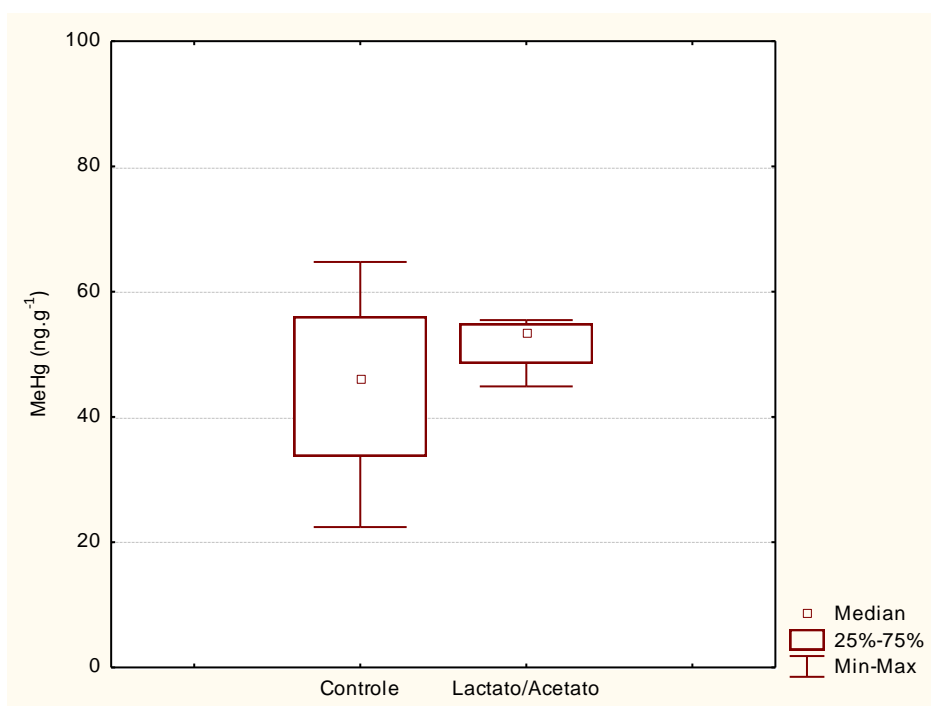


Figura 21. Segundo ensaio de metilação pelas BRS. Tempo de 168 horas.

A figura 22 apresenta a produção de metilmercúrio durante os oito dias de experimento. Esta figura demonstra que as concentrações de metilmercúrio dos controles e do lactato/acetato analisadas no CG-AFS até o tempo de 48 horas estiveram abaixo do limite de detecção da técnica (LDT) de $0,014 \mu\text{g.L}^{-1}$. No tempo de 72 horas os tratamentos com fontes de carbono lactato/acetato elevaram suas concentrações para $0,34 \mu\text{g.L}^{-1}$ e o controle teve um aumento de $0,08 \mu\text{g.L}^{-1}$. No tempo de 96 horas o lactato/acetato passou a decrescer ($0,30 \mu\text{g.L}^{-1}$) chegando a concentração de $0,20 \mu\text{g.L}^{-1}$ no tempo de 120 horas. Já o controle teve um aumento no tempo de 96 horas ($0,31 \mu\text{g.L}^{-1}$) e voltou a cair no tempo de 120 horas ($0,27 \mu\text{g.L}^{-1}$).

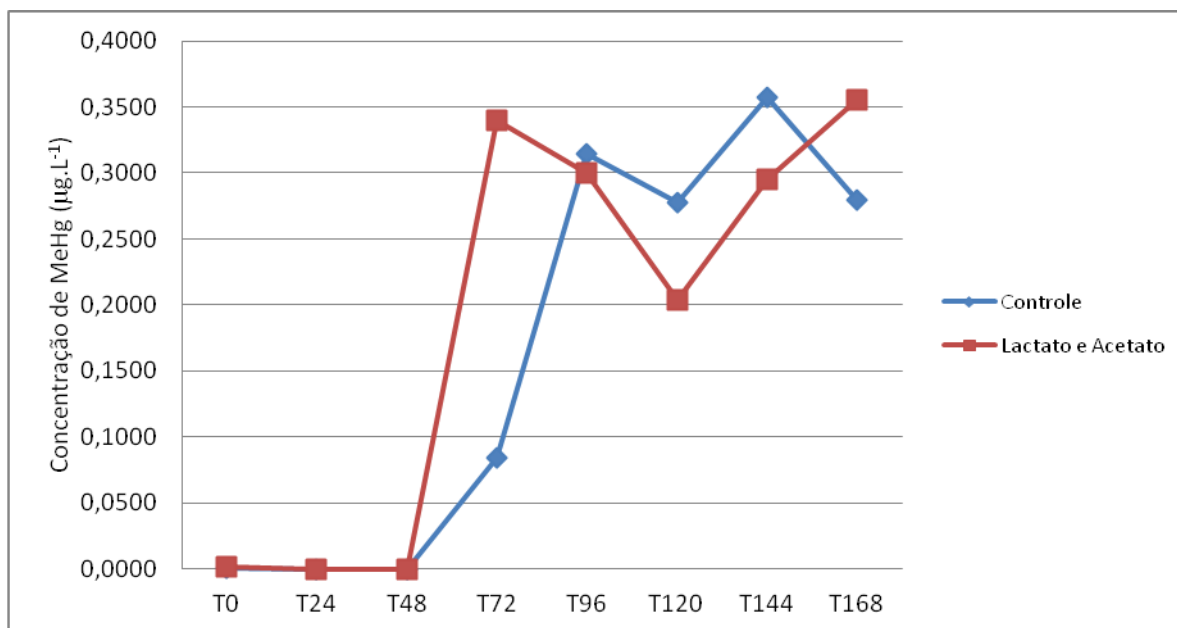


Figura 22. Produção do metilmercúrio ao longo dos 8 dias de experimento.

O restante do tempo os dois tratamentos oscilaram com o lactato/acetato voltando a subir no final do experimento (tempo de 168 horas) com uma concentração de $0,35 \mu\text{g.L}^{-1}$ de mercúrio e o controle caiu a uma concentração de $0,28 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Hg. Estes resultados podem sugerir processos de metilação e desmetilação do Hg ao longo do tempo como sugeriu o trabalho de Baldi et al (1989) onde sete das 37 cepas isoladas de bactérias aeróbias foram capazes de degradar o metilmercúrio para Hg^0 a partir da concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$ de metilmercúrio. Os resultados finais estiveram acima do LDT, porem o aparelho não se mostrou tão sensível quanto a técnica do mercúrio radioativo analisado pelo cintilador líquido.

A análise da produção do $\text{Me } ^{203}\text{Hg}$ no cintilador líquido através da adição do $^{203}\text{HgCl}_2$ mostrou diferenças entre os controles e as fontes de carbono (Lactato/Acetato), durante os cinco dias de incubação. A técnica se mostrou mais precisa e com maior sensibilidade na detecção do metilmercúrio formado (Figura 23).

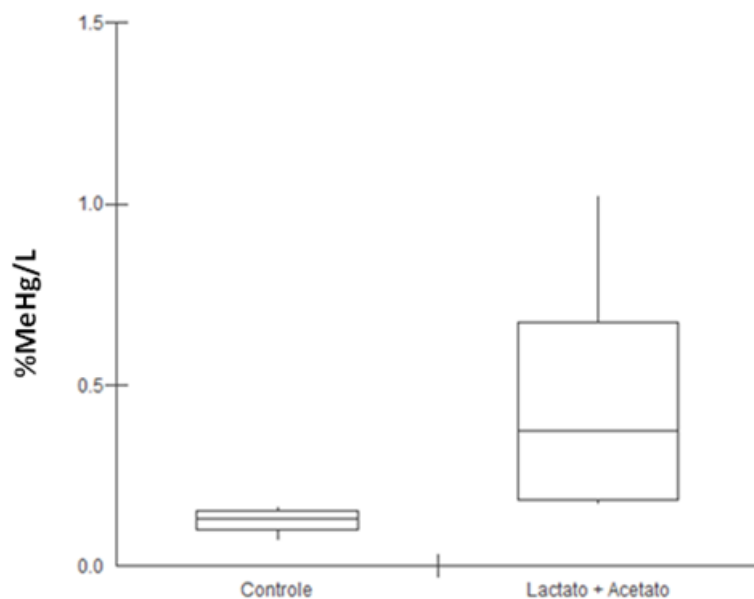


Figura 23. Avaliação da produção de metilmercúrio radioativo nos ensaios de metilação.

As concentrações mínimas e máximas nos controles foram de 0,07 %MeHg/L e 0,16 %MeHg/L. No lactato e acetato as concentrações mínimas e máximas foram de 0,17 %MeHg/L e 1,02 %MeHg/L, nas 72 horas em que ocorreram a incubação.

Comparando as técnicas utilizadas para visualizar a produção de MeHg, a técnica com mercúrio radioativo demonstrou maior sensibilidade na percepção dessa metilação do que as análises no CG-AFS onde a taxa máxima de produção de MeHg observada foi de 0,35 %.

Diversos trabalhos têm sido produzidos em função de se avaliar a metilação do mercúrio pelos microrganismos em especial pelas BRS. Dentre esses trabalhos podemos citar: Choi & Bartha (1993) avaliaram o desempenho de metilação da *Desulfovibrio desulfuricans* em crescimento fermentativo com o meio Postgate lactato-sulfato C e com redução de sulfato com um meio piruvato D e verificaram que no crescimento fermentativo a metilação foi em torno de 1,5 % de uma concentração de $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de mercúrio e menos de 1 % foi metilado no meio contendo o piruvato.

Baldi et al (1989) demonstraram a grande capacidade de bactérias em crescerem em concentrações muito elevadas de mercúrio. Em seus estudos, utilizaram de uma concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ de Hg e das 37 espécies isoladas, apenas 7 transformaram o mercúrio para metilmercúrio.

Em outro estudo Guimarães et al (1998) realizaram uma incubação *in situ* em um lago do Pantanal e adicionaram neste sedimento aproximadamente 43 ng. g^{-1} de $^{203}\text{HgCl}_2$ durante três dias. Verificaram que a metilação no sedimento foi em torno de 1 %. Coelho-Sousa et al (2006) trabalharam também com mercúrio radioativo em um reservatórios no Rio de Janeiro

$^{203}\text{HgCl}_2$ e constataram a produção de 3-4 % de produção de metilmercúrio no sedimento e de 1,5 % no fitoplâncton em 48 horas de experimento. Miranda (2010) encontrou concentrações durante o período de cheia de $0,40 \pm 0,19$ %MeHg/g peso seco/24h e na estação seca foi de $0,74 \pm 0,43$ %MeHg/g peso seco/24h em rizosfera de floresta inundável na região amazônica, utilizando a técnica do mercúrio radioativo com uma concentração inicial de $25 \mu\text{L}$ de $^{203}\text{HgCl}_2$.

Em trabalhos, não publicados, com metilação do mercúrio marcado (^{203}Hg) desenvolvidos por Marcio Rodrigues Miranda (comunicação pessoal) para avaliar a atividade bacteriana do reservatório e tributários da UHE de Samuel, amostras de sedimento foram incubadas a uma concentração de 200 ng.L^{-1} de $^{203}\text{HgCl}_2$ por 24 horas no escuro. A taxa de metilação ambiental encontrada foi 0,8-1,97 %MeHg/g de peso seco/24h para os tributários e de 0,23-0,63 %MeHg/g de peso seco/24h para o rio Jamari. Aparentemente podemos dizer que ensaios “in situ” com amostras ambientais apresentam taxas de metilação mais elevadas, visto que o ambiente possui todos os fatores necessários, para o bom desenvolvimento da comunidade microbiana. Já em laboratório a comunidade microbiana pode levar um tempo maior para se adaptarem as novas condições, apesar de todo o trabalho com enriquecimentos de meios de cultura favorecer o crescimento delas.

Compeau & Bartha (1985) realizaram testes com diferentes fontes de carbono e obtiveram uma melhor produção de metilmercúrio em meio contendo piruvato (203 ng.g^{-1} de MeHg no sedimento partindo de uma concentração inicial de $75 \mu\text{g.g}^{-1}$ de HgCl_2) e Lactato (40 ng.g^{-1} de MeHg de uma concentração inicial de $75 \mu\text{g.g}^{-1}$ de HgCl_2). Outras fontes utilizadas como a glicose e o acetato não obtiveram bons resultados. Quanto aos testes de inibição das bactérias sulfato redutoras com molibdato de sódio (20 mM) ocorreu uma diminuição da metilação do mercúrio em 95 % em dez dias de experimento.

King et al (2000) em seus estudos com metilação do mercúrio por BRS isoladas de sedimento encontraram melhores produções de metilmercúrio após 120 h de experimento nos tratamentos com acetato ($162 \pm 6,01 \text{ ng.g}^{-1}$), seguido do lactato ($101 \pm 6,23 \text{ ng.g}^{-1}$), partindo de uma concentração inicial de 100 ng.mL^{-1} de nitrato de mercúrio. E constataram que entre os isolados os membros da família Desulfobacteraceae tiveram o melhor desempenho. Achá et al (2010) também constataram a família Desulfobacteraceae e a fonte de carbono acetato como os melhores para a metilação do Hg.

Os valores de Hg-T encontrados nos ensaios de metilação se mantiveram próximas da concentração inicial de nitrato de mercúrio adicionada aos meios de cultura de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. A figura 24 demonstra as concentrações de Hg-T encontradas no segundo ensaio de metilação.

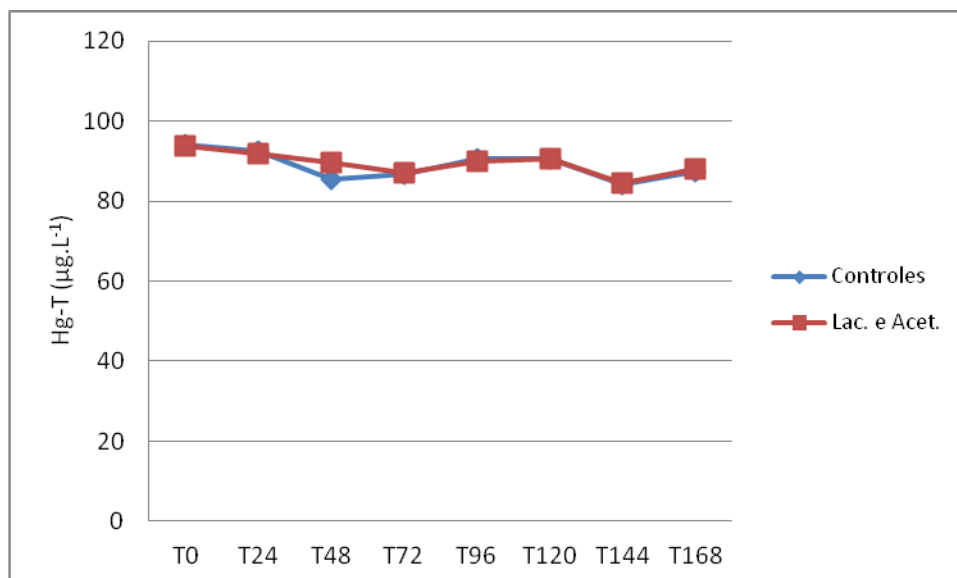


Figura 24. Concentração de Hg-T no 2º ensaio de metilação.

As concentrações de Hg-T ocorrendo dentro da faixa de aceitabilidade analítica com coeficiente de variação entre 80 % a 120 %. Os controles tiveram uma recuperação de 90 % e o lactato/acetato tiveram uma recuperação de 97 %. A recuperação do branco foi de 91%. Podemos dizer que as amostra não sofreram perdas excessivas de Hg que pudessem interferir nas análises.

Quanto à avaliação morfológica dos microrganismos presentes nos ensaios de metilação, a coloração de gram se mostrou negativa (Figura 25) em todos os ensaios, demonstrando desta maneira a possível presença das BRS nos meios de cultura, já que todos os exemplares desta família são gram-negativas. A maioria das formas vistas eram bastonetes.

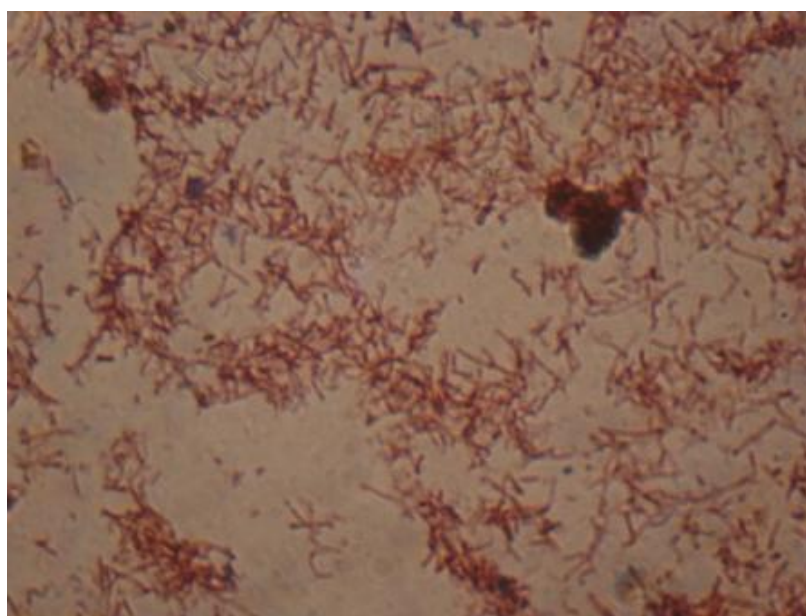


Figura 25. Coloração de gram nos ensaios de metilação do Hg.

5.4. Quantificação das BRS pelo Real Time PCR

O segundo ensaio de metilação foi selecionado para a análise molecular. A extração e quantificação do DNA total bacteriano no início e no final do experimento (Figura 26) demonstraram maior quantidade de DNA extraído dos controles no início (0,16 ng/μL) do que dos tratamentos com fonte de carbono (0,084 ng/μL). As concentrações médias no final do experimento foram iguais para os dois tratamentos (0,81 e 0,80 ng/μL, respectivamente).

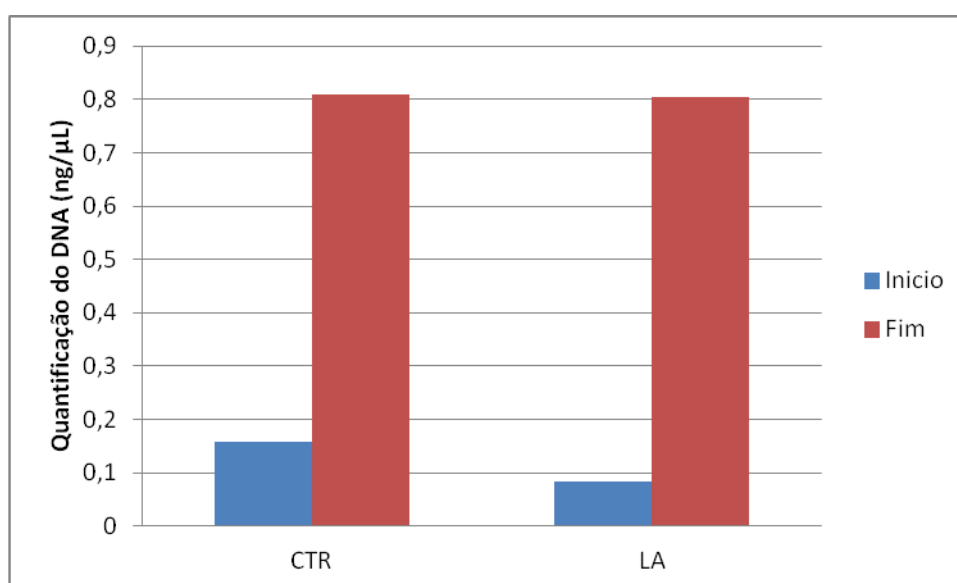


Figura 26. Quantificação da extração do DNA total nos ensaios de metilação do Hg. CTR=controle e LA=lactato/acetato

Podemos perceber que a quantidade de biomassa bacteriana está relacionada com a quantidade de MeHg produzida. Visto que no início do experimento onde a quantidade de biomassa é baixa, consequentemente menos DNA extraído, observamos uma baixíssima produção de MeHg (Figura 22). Já no final do experimento onde existe uma grande quantidade de DNA a produção de MeHg também aumenta. Para os controles o aumento da concentração de DNA do início ao final do experimento foi de 5 vezes, já para o lactato/acetato esse aumento foi de 10 vezes demonstrando a necessidade dos microrganismos por fontes de carbono.

A curva de calibração para a quantificação do DNA das BRS obteve um R^2 0,9901. Os níveis da abundância das BRS (Figura 27) durante o início do experimento foram de $7,27 \times 10^2$ cópias/μL de DNA para os controles e $1,94 \times 10^2$ cópias/μL de DNA para o lactato/acetato. No final do experimento a quantificação média foi de $1,12 \times 10^3$ cópias/μL de DNA para os controles e $1,04 \times 10^3$ cópias/μL de DNA para o lactato/acetato. Os controles, portanto,

apresentaram uma quantificação um pouco maior do que os tratamentos com fonte de carbono lactato/acetato. No sedimento da UHE - Samuel a quantificação das BRS foi de $6,90 \times 10^5$ cópias/ μL de DNA.

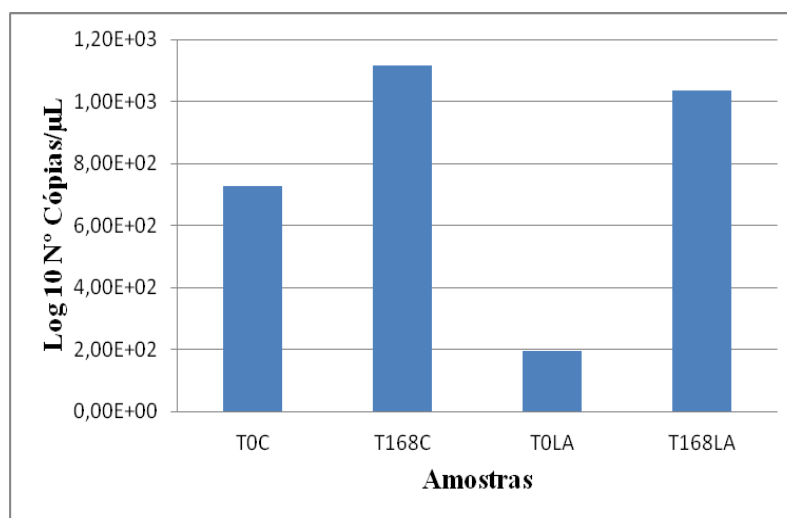


Figura 27. Quantificação do DNA das BRS pela técnica do Real Time PCR. T0C= tempo inicial do controle, T168C= tempo final do controle, T0LA= tempo inicial do lactato/acetato e T168LA= tempo final do lactato/acetato.

Os controles tiveram um aumento na quantificação das BRS no início ao final do experimento na ordem de 1 vez. Já as fontes de carbono lactato e acetato tiveram um aumento na ordem de 5 vezes. Relacionando esses resultados com a quantificação da extração do DNA bacteriano presente nos ensaios de metilação percebemos um baixo crescimento das BRS. Sendo explicado pela presença de outros microrganismos nesses ensaios e os possíveis processos de competição pelos nutrientes presentes no meio. Porém as concentrações de BRS encontradas nesses meios de culturas são significativas e de acordo com outros estudos.

Trabalhos desenvolvidos por Cortez (2009) tiveram sucesso na quantificação das BRS em amostras ambientais, como os esgotos industriais altamente salinos, utilizando os genes *dsr A* e *dsr B* obtendo uma quantificação de $2,69 \times 10^6$ alvos/mL. Neretin et al (2003) também tiveram sucesso em seus experimentos com a espécie de BRS *Desulfobacterium autotrophicum* com diferentes fontes de carbono, onde obtiveram uma quantificação de 310 cópias de DNA por célula no meio de cultura onde havia respiração por tiosulfato com o lactato. Leloup et al (2004), utilizaram os genes *dsr1F/dsr4R* e verificou uma abundância no do grupos das BRS no sedimento do estuário do Seine na França de $0,045 \times 10^3$ a $6,63 \times 10^3$ cópias do *dsrAB* por ng do DNA extraído e verificaram que onde havia maiores abundâncias das BRS havia uma diminuição do sulfato.

Achá et al (2010) estudaram três famílias de BRS (Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae e Desulfovibrionaceae) em perifítons em um lago amazônico (La Granja na Bolívia). Em seu estudo o grupo mais abundante através da técnica do PCR em tempo real foi Desulfobacteraceae e Desulfovibrionaceae representando 3,34 % da comunidade de bactérias total. Achá et al (2010) também estudaram a influência dessas bactérias na metilação do mercúrio (concentração final de 2 ng mL⁻¹ de ²⁰⁰HgCl₂) e constataram que correlacionando a abundância relativa das famílias com a formação de metilmercúrio com diferentes fontes de carbono a 10 mM, as Desulfobacteraceae, estavam entre as principais metiladoras do mercúrio, e o tratamento com acetato mostrou melhor metilação.

Este trabalho apresentou uma boa quantificação das BRS nos experimentos. E demonstrou que apesar dos controles terem apresentado uma quantificação maior de BRS do que o lactato/acetato os meios de cultura onde estas fontes de carbono estavam presentes apresentaram taxas de metilação do mercúrio superiores aos controles onde não havia presença de carbono. Isso pode ser explicado pelo fato de a presença das fontes de carbono pode ter auxiliado na metilação do mercúrio. Os trabalhos de King et al (2000) e Achá et al (2010), também confirmam estes resultados visto a necessidade de fontes de carbonos específicas para servirem de doadoras de elétrons para as BRS aumentarem o seu potencial de metilação.

CONCLUSÕES

Este estudo constatou a presença de grandes quantidades de BRS ($1,04 \times 10^3$ de DNA cópias/ μL) através da técnica do PCR em tempo real no sedimento de fundo do Reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel.

O estudo apresentou uma taxa de metilação do Hg pelas BRS em torno de 0,35 % do Hg adicionado ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$). Entretanto, a técnica do mercúrio radioativo mostrou-se mais sensível na detecção do metilmercúrio formado com uma taxa final de metilação de 1,02 %MeHg/L/72 horas nos ensaios com fonte de carbono. Estes resultados demonstraram proporções de metilações ambientais iguais aos encontrados por outros autores sobre a metilação do Hg.

Em todos os ensaios de metilação ocorreu a formação de metilmercúrio inclusive nos controles sem fontes de carbono, porém, as maiores concentrações de MeHg formado foram encontrados nos ensaios que apresentavam carbono como substrato. A concentração de molibdato de sódio utilizada não foi suficiente para inibir a produção de MeHg pelas BRS, podendo ser explicado pela baixa concentração utilizada ou pela provável presença de outras bactérias que estariam metilando o Hg no meio de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOIM, M. C. R.; BARBOSA, J. C.; COUTINHO, H. L. C.; ROSADO, A. S. 2004. **Avaliação de diversidade microbiana em amostras de solos: técnica do PCR/DGGE (Protocolo Laboratorial)**. Embrapa Solos, 31 p. (Embrapa Solos. Documentos, n. 68) ISSN 1517-2627. Rio de Janeiro.
- ACHÁ, D.; HINTELMANN, H.; YEE, J. 2010. **Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region**. Chemosphere doi: 10.1016/j.chemosphere.10.1050.
- ALMEIDA, R. de; OLIVEIRA, R. C. de; GOMES J. P. DE O.; NASCIMENTO E. L. do; DE CARVALHO, D. P.; BASTOS, W. R.; BERNARDI, J. V. E. E LANDIM, P. M. B. 2005. **Avaliação da concentração de mercúrio em sólidos em suspensão e perfis de sedimentos de fundo no lago Puruzinho, Amazônia Ocidental**. X Congresso Brasileiro de Geoquímica e II Simpósio de Geoquímica dos Países do Mercosul Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil.
- ALMEIDA, E. S. C.; FREIRE, M.G.M.; RABELO, S. K. L. 2009. **Avaliação dos efeitos da presença de bactérias redutoras de sulfato em linhas de produção de petróleo na Bacia de Campos**. Perspectivas online V. 03, No. 10.
- AZEVEDO, F. A. & RAMOS, A. C. 1993. **Bibliografia brasileira de mercúrio. Aspectos ambientais e toxicológicos**. Bol. Téc. CEPED, v. 8, n. 1, p. 7 - 13.
- AZEVEDO, F. A. 1993. **Dinâmica ambiental e riscos do mercúrio**. TECBAHIA R. Baiana Tecnol., v. 1, n. 1, p. 32 a 48.
- AZEVEDO, F. A.; SASS, V.; GARCIA R. J.; MONTEIRO, T.; SOUZA NETO, M. J. de. 1994. **Determinação analítica do mercúrio**. TECBAHIA R. Baiana Tecnol., v. 9, n. 2, p. 28 a 40.
- AZEVEDO, F. A.; NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. 2001. **(Caderno de Meio Ambiente) Aspectos Atualizados dos Riscos Toxicológicos do Mercúrio**. TECBAHIA R. Baiana Tecnol., v. 16, n. 3, p.87 a 104.
- BALDI, F.; FILIPPELLI, M.; OLSON, G. J. 1989. **Biotransformation of mercury by bacteria isolated from a river collecting cinnabar mine waters**. Microb. Ecol. 17: 263-274.
- BASTOS, W. R. 1997. **Métodos de digestão utilizando microondas para determinação automatizada de Hg em amostras ambientais e humanas: implantação de laboratórios e avaliação da qualidade analítica**. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro. pp 118. Rio de Janeiro - RJ.
- BASTOS, W. R.; MALM, O.; PFEIFFER, W. C.; CLEARY, D. 1998. **Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brazil**. Ciência Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science. v, 50, n, 4, p. 255-260.
- BASTOS, W. R.; GOMES, J. P. O.; OLIVEIRA, R. C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E. L.; BERNARDI, J. V. E.; LACERDA, L. D.; SILVEIRA, E. G.; PFEIFFER, W. C. 2006.

Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. Science of the Total Environment 368, 344–351.

BASTOS, W. R. et al 2011. **Hidrobiogeoquímica do Mercúrio e Outros Metais Pesados no Rio Madeira - UHE Santo Antônio.** Relatório de Avaliação Ambiental – Santo Antônio Energia.

BENOIT, J. M.; GILMOUR, C. C.; MASON, R. P. 2001. **The influence of sulfide on solid-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3).** Environ. Sci. Technol. 35, 127-132.

BEN-DOV, E.; BRENNER, A.; KUSHMARO, A. 2007. **Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes.** DOI: 10.1007/s00248-007-9233-2 & Volume 54, 439–451 & Springer Science.

BERRÊDO, J. F.; COSTA, M. L.; SOCORRO, M. P. 2008. **Efeitos das variações sazonais do clima tropical úmido sobre as águas e sedimentos de manguezais do estuário do rio Marapanim, costa nordeste do Estado do Pará.** Acta Amazônica, vol. 38(3) 473 – 482

BILLEN, G.; JOIRIS, C.; WOLLAST, R. 1974. **A bacterial methylmercury mineralizing activity in river sediments.** Wmer Rein.arch Vol. 5. pp. 219 - 225. Pergamon Press. Printed in Great Britain.

BISINOTI, M. C. 2002. **Produção de Hg orgânico em sedimentos tropicais a partir do Hg^0 : experimentos em microcosmos.** Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas-SP-UNICAMP. pp 160.

BISINOTI, M. C. & JARDIM, W. F. 2004. **O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente.** Quim. Nova, Vol. 27, No. 4, 593-600.

BOENING, D. W. 2000. **Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review.** Chemosphere 40, 1335-1351.

BOSZKE, L.; KOWALSKI, A.; GLOSINSKA, G.; SZAREK, R.; SIEPAK, J. 2003. **Environmental factors affecting speciation of mercury in the bottom sediments; an overview.** Polish Journal of Environmental Studies Vol. 12, no. 1, 5-13.

BRANCO, S. M. 1990. **Energia e meio ambiente.** Editora Moderna. 9º edição São Paulo. p 96.

BRUCHA, G. 2007. **Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo.** Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, pp 239. São Carlos – SP.

CARDOSO, P.C.S.; LIMA, P. L.; BAHIA, M.O.; AMORIM, M.I.M.; BURBANO, R.R.; FARIAS, R.A.F. 2001. **Efeitos biológicos do mercúrio e seus derivados em seres humanos: uma revisão bibliográfica.** Revista paraense de medicina 15(4):51-58.

- CASTRO, H. F.; WILLIAMS, A. N. H.; OGRAM, B. A. 2000. **Phylogeny of sulfate-reducing bacteria**. FEMS Microbiology Ecology 31. 1-9
- CELO, V.; LEAN, D. R. S.; SCOTT, S. L. 2006. **Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment**. Science of the Total Environment 368, 126–137.
- CHOI, SUNG-CHAN & BARTHA, R. 1993. **Cobalamin-Mediated Mercury Methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS**. Applied and Environmental Microbiology, p. 290-295, Vol. 59, no. 1.
- COELHO R. R. R.; PEREIRA A. F.; SOUTO-PADRON T.; VERMELHO A. B. 2006. **Práticas de Microbiologia**. Editora Guanabara Koogan; 1º ed. Rio de Janeiro - RJ.
- COELHO-SOUZA, S. A.; MIRANDA, M. R.; GUIMARÃES, J. R. D. 2007. **A importância das macrófitas aquáticas no ciclo do mercúrio na bacia do rio Ttapajós (PA)**. Oecol. Bras., 11 (2): 252-263.
- COMPEAU, G.C.; BARTHA, R. 1985. **Sulphate-Reducing Bactéria: Principal Methylators of Mercury in Anoxic Estuarine Sediment**. Appl and Environman Microbiol, p. 498-502.
- COQUERY, M.; COSSA, D.; PERETYAZHKO, T.; AZEMARD, S.; CHARLET, L. 2003. **Methylmercury formation in the anoxic waters of the Petit-Saut reservoir (French Guiana) and its spreading in the adjacent Sinnamary River**. J.Phys.IV France 107. 327-331.
- CORTEZ, M. T. S. C. 2009. **Abordagem molecular na resolução de problemas com biocorrosão**. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro. Portugal. p. 130.
- DINIZ, A. D. 2010. **Origem e dinâmica do mercúrio em sistemas de transformação latossolo-podzol na bacia do rio Negro, Amazonas**. Dissertação apresentada ao Instituto de Geociencias e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista. pp 142. Rio Claro, São Paulo.
- EQUIPE DO LABORATÓRIO DE BIOGEOQUÍMICA AMBIENTAL WOLFGANG C. PFEIFFER. 2011. **Hidrobiogeoquímica do Mercúrio e Outros Metais Pesados no Rio Madeira - UHE Santo Antônio**. Relatório técnico para a Santo Antônio Energia encaminhado ao IBAMA. Universidade Federal de Rondônia. 226p.
- EPA-452/R-97-007. 1997. **Mercury study report to congress volume V: health effects of mercury and mercury compounds United States**. Environmental Protection Agency.
- EPA 1630 U.S. 2001. **Methylmercury in water by distillation, aqueous ethylation, purge and trap, and CVAFS**. EPA 821-R-01-020.
- FEARNSIDE, P. M. 2005. **Brazil's Samuel Dam: Lessons for Hydroelectric Development Policy and the Environment in Amazonia**. Environmental Management Vol. 35, No. 1, pp. 1–19. Manaus-Amazonas, Brazil.

FLEMING, E.J.; MACK, E.E.; GREEN, P.G. & NELSON, D.C. 2006. **Mercury methylation from unexpected sources: molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium.** *Applied Environmental Microbiology*, 72: 457-464.

FRANKLIN, R. L. 2010. **Determinação de mercúrio total e orgânico e avaliação dos processos de metilação e desmetilação em sedimentos do reservatório Rio Grande, Estado de São Paulo.** Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. pp 158. São Paulo.

FOREST, E.; ZAIAT, M; MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; PAIM, A. P. S.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; CANTO, C. S.; DAMASCENO, L. H. S.; BORZANI, W. 2005. **Métodos de análises físico-químicas de rotina de águas residuárias tratadas biologicamente.** SHS/EESC/USP – DEQ/UFSCar – DQA/EEM/IMT.

GEETS, J.; BORREMANS, B.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D.; VANGRONSVELD, J.; LELIE, D. V. D.; VANBROEKHOVEN, K. 2006. **DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria.** *Journal of Microbiological Methods* 66. 194– 205.

GIBSON, G. R. 1990. **Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria.** *Journal of Applied Bacteriology* 69. 769-797.

GILMOUR, C. C. & HENRY, E. A. 1991. **Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition.** *Environmental Pollution* 71. 131-169.

GILMOUR, C. C.; HENRY, E. A.; MITCHELL, A. 1992. **Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments.** *Environ. Sci. Technol.* 26, 2281-2287

GUIMARÃES, J. R. D.; MALM, O. & PFEIFFER, W. C. 1995. **A simplified radiochemical technique for measurements of net mercury methylation rates in aquatic systems near gold mining areas, Amazon, Brazil.** *The Science of the Total Environment*, 175: 151-162.

GUIMARÃES, J. R. D.; MEILI, M.; MALM, O.; BRITO, E. M. S. 1998. **Hg methylation in sediments and floating meadows of a tropical lake in the Pantanal floodplain, Brazil.** *The Science of the Total Environment* 213. 165-175.

GUIMARÃES, J. R. D.; ROULET, M.; LUCOTTE, M.; MERGLER, D. 2000. **Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations.** *The Science of the Total Environment* 261. 91 - 98.

HAMILTON, W.A. 1998. **Bioenergetics of sulphate-reducing bacteria in relation to their environmental impact.** *Biodegradation* 9: 201–212.

HOLANDA, I. B. B. 2008. **Investigação das concentrações de mercúrio no tecido muscular e hepático de peixes (UHE-Samuel/Rondônia).** Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR. Porto Velho (RO) p. 38.

- ILHAM-SUNGUR, E.; CANSEVER, N.; COTUK, A. 2007. **Microbial corrosion of galvanized steel by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (desulfovibrio sp.)**. Corrosion Science. 49:1097-1109.
- JEREMIASON, J.; ENGSTROM, D.; NATER, E.S.E.; JOHNSON, B.; ALMENDINGER, J.; MONSON, B.; KOLKA, R. 2006. **Sulfate addition increases methylmercury production in an experimental Wetland**. Environmental Science & Technology / Vol. 40, no. 12, 2006 3800-3806.
- JUNK, W. J. & MELLO, J. A. S. N. 1990. **Impactos ecológicos das represas hidrelétricas na bacia amazônica brasileira**. *Estud. av.* [online]., vol.4, n.8, pp. 126-143. ISSN 0103-4014.
- KASPER, D. 2008. **Efeito da barragem nas concentrações de mercúrio na biota aquática à jusante de um reservatório amazônico (Usina Hidrelétrica de Samuel, RO)**. UFRJ/IBCCF, 2008. Dissertação apresentada ao Mestrado em Biofísica Ambiental – UFRJ/IBCCF/Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. pp 147.
- KERRY, A.; WELBOURN, P. M.; PRUCHA, B.; MIED, G. 1991. **Mercury methylation by sulphate-reducing bacteria from sediments of an acid stressed lake**. *Water, Air, and Soil Pollution* 56: 565-575.
- KING, J. K.; KOSTKA, J. E.; FRISCHER, M. E.; SAUNDERS, M. 2000. **Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments**. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2430–2437 Vol. 66, No. 6.
- KING, S. A.; BEHNKE, S.; SLACK, K.; KRABBENHOFT, D. P.; NORDSTROM, D. K.; BURR, M. D.; STRIEGL, R. G. 2006. **Mercury in water and biomass of microbial communities in hot springs of Yellowstone National Park, USA**. *Applied Geochemistry* 21, 1868–1879.
- KONDO, J.; NEDWELL, D. B.; PURDY, K. J.; DE QUEIROZ SILVA, S. 2004. **Detection and enumeration of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments by competitive PCR**. *Geomicrobiol J* 21, 145–157.
- LACERDA, L.D. & PFEIFFER, W.C. 1992. **Mercury from gold mining in the Amazon environment – An overview**. *Química Nova* 15(2), Rio de Janeiro - RJ.
- LEFF, E. 2006. **Epistemologia ambiental**. 4. ed. São Paulo.
- LEITE, V. D. & POVINELLI, J. 1999. **Comportamento dos sólidos totais no processo de digestão anaeróbia de resíduos sólidos urbanos e industriais**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.3, n.2, p.229-232. Campina Grande, PB.
- LELOUP, J.; QUILLET, L.; OGER, C.; BOUST, D. PETIT, F. 2004. **Molecular quantification of sulfate-reducing microorganisms (carrying dsrAB genes) by competitive PCR in estuarine sediments**. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 207 - 214
- MACKAY, I. M. 2007. **Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization**. Editora Horizon Scientific Press, p. 454.

- MALM, O.; CASTRO, M. B.; BASTOS, W. R.; BRANCHES, F. J. P.; GUIMARÃES, J. R. D.; ZUFFO, C. E.; PFEIFFER, W. C. 1995. **An assessment of Hg pollution in different goldmining areas, Amazon Brazil**. The Science of the Total Environment 175, 127-140.
- MALM, O. & LACERDA, L.D. 2008. **Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas**. Estudos Avançados 22 (63).
- MAURO, J. B. N.; GUIMARÃES, J. R. D.; MELAMED, R. 1999. **Mercury methylation in a tropical macrophyte: influence of abiotic parameters**. Appl. Organometal. Chem. 13, 631–636.
- MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. 2008. **Microbiologia ambiental**. Embrapa 2ª edição, rev. ampl. Jaguariúna 647 p.
- MIRANDA, M. R.; COELHO-SOUZA, S. A.; GUIMARÃES, J. R. D.; CORREIA, R. R. S.; OLIVEIRA, D. 2007. **Mercúrio em sistemas aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação**. Oecol. Bras., 11 (2): 81-92.
- MIRANDA, M. R. 2010. **Formação de metilmercúrio na bacia do rio Madeira, Rondônia**. Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro (RO) p. 149.
- MORI, Y.; PURDY, K. J.; OAKLEY, B. B.; KONDO, R. 2010. **Comprehensive detection of phototrophic sulfur bacteria using PCR primers that target reverse dissimilatory sulfite reductase gene**. Microbes Environ. Vol. 25, No. 3, 190–196.
- NASCIMENTO, E. L. 2006. **Concentração de mercúrio no plâncton e fatores ecológicos no reservatório da U.H.E. – Samuel – Amazônia Ocidental (Rondônia / Brasil)**. Dissertação apresentada à Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR. Porto Velho (RO) p. 119.
- NERETIN, L. N.; SCHIPPERS, A.; PERNTHALER, A.; HAMANN, K.; AMANN, R.; JØRGENSEN, B. B. 2003. **Quantification of dissimilatory (bi)sulphite reductase gene expression in *Desulfobacterium autotrophicum* using real-time RT-PCR**. Environmental Microbiology 5 (8), 660–671.
- OLIVEIRA, F. R. 2007. **Uso de Bactérias Redutoras de Sulfato no tratamento de efluentes contendo sulfato e metais**. In: XV JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. CETEM/MCT.
- PAK, K. R. & BARTHA, R. 1998. **Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens**. Applied and Environmental Microbiology, p. 1987–1990.
- PATRÍCIO, I. C. 2009. **Caracterização bioquímica e molecular de bactérias redutoras de sulfato isoladas na RPPN do Caraça, MG**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto. pp 91. Ouro Preto, MG.
- PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L.D.; MALM, O.; SOUZA, C.M.M.; SILVEIRA, E.G.; BASTOS, W.R. 1989. **Mercury concentrations in inland waters of gold mining areas in Rondonia, Brazil**. The Science of the Total Environment, 87/88, 233-240.

POSTGATE, J. R. 1979. **The sulfate-reducing bacteria**. Cambridge University Press. Cup Archive, QR 92, p. 151.

REIS JUNIOR, F. B. dos; MENDES, I. de C.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; REIS, V.M. 2002. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Embrapa Cerrados, 33 p. ISSN 1517 – 5111. Planaltina-DF.

ROSA, R.S.; MESSIAS, R.A.; AMBROZINE, B. 2003. **Importância da compreensão dos ciclos biogeoquímicos para o desenvolvimento sustentável**. Universidade de São Paulo, Instituto de química de São Carlos.

ROULET, M., LUCOTTE M., SAINT-AUBIN, A., TRAN, S., RHÉAULT, I., FARELLA, N., DE JESUS DA SILVA, F., DEZENCOURT J., SOUSA-PASSOS, C.J., SANTOS SOARES, G., GUIMARÃES, J.R.D., MERGLER, D. & AMORIM, M. 1998. **The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós river valley, Pará state, Brazil**. *Sci Tot Environ*, 223:1-24.

ROULET, M.; LUCOTE, M.; GUIMARÃES, J.R.D.; RHEAULT, T. 2000. **Methylmercury in water, seston, and ephyphyton of an Amazonia river and its floodplain, Tapajós river, Brazil**. *The Science of the Total Environment*, 261. 43 – 59.

ROULET, M.; GUIMARÃES, J. R. D.; LUCOTTE, M. 2001. **Methylmercury production and accumulation in sediments and soils of an Amazonian floodplain – effect of seasonal inundation**. *Water, Air, and Soil Pollution* 128: 41–60.

SAIA, F. T. 2005. **Avaliação do potencial da degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), inoculado com sedimentos do estuário da Baixada Santista - Estado de São Paulo**. Tese de doutorado apresentado no Departamento de Hidráulica e Saneamento - EESC-USP.

SAKAMOTO, I. K. & VARESCHE, M. B. A. 2009. **Quantificação de bactérias redutoras de sulfato por NMP**. Curso de treinamento, Rede de Laboratórios Nacionais de Microbiologia Aplicada ao Saneamento Ambiental – LNMSA. São Carlos, SP.

SCHIPPERS, A. & NERETIN, L. N. 2006. **Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR**. *Environmental Microbiology*, v.8, p. 1251 – 1260.

SILVEIRA, E. G.; GALI, P. A. S.; BARBOSA, R. V.; BRAGA, I. C. 1998. **O mercúrio nos garimpos de ouro do rio Madeira/RO**. *Revista de educação, cultura e meio ambiente*. n° 12, Vol II.

SOUZA, J. R. & BARBOSA, A. C. 2000. **Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia**. *Química Nova na Escola* n° 12.

SOUZA, K. A. 2009. **Avaliação da biogênese de sulfeto sob diferentes concentrações de bactérias redutoras de nitrato, bactérias redutoras de sulfato e nitrato**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro. pp. 143.

- SPENCE, C.; WHITEHEAD, T. R.; COTTA, M. A. 2008. **Development and comparison of SYBR Green quantitative real-time PCR assays for detection and enumeration of sulfate-reducing bacteria in stored swine manure.** Journal of Applied Microbiology 105. 2143–2152.
- STOOR, R. W.; HURLEY, J. P.; BABIARZ, C. L.; ARMSTRONG, D. E. 2006. **Subsurface sources of methyl mercury to Lake Superior from a wetland–forested watershed.** Science of the Total Environment 368: 99–110.
- STUBNER, S. 2004. **Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR.** Journal of Microbiological Methods, v.57, p. 219-230.
- SUNDERLAND, E. M.; GOBAS, F. A. P. C.; BRANFIREUN, B. A.; HEYES, A. 2006. **Environmental controls on the speciation and distribution of mercury in coastal sediments.** Marine Chemistry 102. 111– 123.
- TUNDISI, J. G. 2007. **Exploração do potencial hidrelétrico da Amazônia.** Estudos Avançados 21 (59).
- VAZOLLER, R. F. 1995. **Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas.** São Carlos, SP. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 259p.
- VIANA, J. P. 2002. **Physical and chemical post-dam alterations in the Jamari River, a hydroelectric-developed river of the Brazilian Amazon.** Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Hydrobiologia 472: 235–247, 2002.
- WASSERMAN, J. C.; HACON, S. S.; WASSERMAN, M. A. 2001. **O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico.** Mundo & Vida, Vol. 2 (1/2).
- WINDMÖLLER, C. C.; SANTOS, R. C.; ATHAYDE, M.; PALMIERI, H. E. L. 2007. **Distribuição e especiação de mercúrio em sedimentos de áreas de garimpo de ouro do Quadrilátero Ferrífero (MG).** Quim. Nova, Vol. 30, No. 5, 1088-1094.
- WOOD, J. M. 1974. **Biological cycles for toxic elements in the environment.** Science, New series. Vol. 183, no. 4129, pp. 1049-1052.

ANEXOS

1. Procedimento para preparo do meio Postgate C (Sakamoto & Varesche, 2009):

- Pesar os sais separadamente em béquer limpo e seco;
- Ferver água ultra purificada, usar erlenmeyer com volume 50% maior ao volume de meio a ser preparado;
- Submeter o conjunto (erlenmeyer e água) a atmosfera de gás nitrogênio (100%), por borbulhamento, com auxílio de pipeta e mangueira de silicone acoplados ao sistema de gases, até a temperatura atingir mais ou menos 40 °C;
- Dissolver os sais no béquer com volume mínimo de água anaeróbia e adicioná-los no erlenmeyer na ordem apresentada na Tabela 1;
- Ajustar o volume para 1000 mL, com auxílio de um balão volumétrico ou proveta;
- Ajustar o pH para 7,2 com NaOH = 7 pastilhas;
- Submeter novamente o conjunto (erlenmeyer e água) ao fluxo de nitrogênio (100%) por borbulhamento durante 20 minutos com auxílio de pipeta e mangueira de silicone acoplada ao sistema de gases;
- Colocar frascos para retirada de oxigênio, por meio de N₂ (100%) com auxílio de uma mangueira de pvc reforçada, acopladas à seringa com agulha;
- Adicionar meio de cultura e colocar a tampa de butila nos frascos com meio e manter fechado por 30 segundos;
- Lacrar os frascos com auxílio de lacrador;
- Esterilizar durante 20 minutos por autoclavação à 121 °C e 1 atm;
- Armazenar à temperatura ambiente e ausência de luz;
- O meio poderá, dessa forma, ser armazenado e utilizado como solução estoque até 6 meses.

2. Procedimento para preparo da solução de sulfeto de sódio (Na₂S. 9H₂O) 5 % (Sakamoto & Varesche, 2009):

- Autoclavar o sistema Millipore para filtração e os seguintes materiais: frascos e tampas para armazenar a solução; as tampas devem ser colocadas em placas de petri de vidro; pipetas acopladas a mangueiras de silicone; pipeta graduada para transferir a

solução para os frascos; membrana em Ester de celulose (0,22 μm) embrulhada em papel de alumínio;

- Ferver a água ultrapurificada, usar erlenmeyer com volume 50 % maior ao volume da solução a ser preparado (ferver a água auxilia na expulsão do O_2);
- Submeter o conjunto (erlenmeyer e água) a atmosfera de gás nitrogênio (100 %), por borbulhamento, com auxílio de pipeta e mangueira de silicone acoplado ao sistema de gases até temperatura atingir $\pm 40^\circ\text{C}$;
- Secar o sulfeto em papel de filtro com espátula plástica; pesar o reagente no Becker seco;
- Dissolver o sulfeto de sódio no Becker com volume mínimo de água anaeróbia;
- Ajustar o volume para 100 mL, com auxílio de um balão volumétrico ou proveta
- Fluxionar nitrogênio 100 % como auxílio de uma pipeta e mangueira de silicone acoplada ao sistema de distribuição de gás por 10 minutos;
- Esterilizar a solução por filtração em membrana em Ester de celulose (0,22 μm) utilizando o sistema Millipore em condições de assepsia;
- Colocar frascos de antibiótico (30 mL) para a retirada de oxigênio, por meio de fluxo de N_2 (100 %) com auxílio de uma mangueira de pvc reforçada, acopladas a seringa com agulhas;
- Distribuir a solução e frascos estéreis sob fluxo de nitrogênio, em condições de assepsia por meio do bico de Bunsen;
- Colocar a tampa de butila nos frascos com solução sob fluxo do mesmo gás e manter fechado por 30 segundos, em seguida lacrar os frascos.

3. Procedimento para preparação das soluções traço de metais:

O preparo das soluções de metais segue o mesmo procedimento da preparação do meio de cultura Postgate C. Os reagentes foram pesados e dissolvidos em água Milli-Q, sob fluxo de Nitrogênio (100%) na ordem apresentada na Tabela 7, de acordo com Saia (2005). O pH da solução foi mantido em 7,0 pela adição de KOH 10% m/v. A solução foi distribuída em frascos Duran de 250 mL ou 500 mL, fechados com tampas de batoque de butila e lacrados com rolhas de borracha. Após esterilização em autoclave, os frascos foram armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Tabela 7. Composição da solução traços de metais.

Componente	Quantidade
Ácido nitriloacético (NTA)	1,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,28g
Na ₂ WO ₄ .2 H ₂ O	0,165g
Na ₂ SeO ₃	0,15g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01g
AlK (SO ₄) ₂ .12H ₂ O	0,02g
H ₃ BO ₃	0,01g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000mL

Fonte: SAIA (2005).

4. Procedimento para preparação das soluções de vitaminas:

O preparo das soluções de vitaminas seguiu os mesmos procedimentos da preparação da solução de sulfeto de sódio. A composição da solução de vitaminas está descrita na Tabela 8. O preparo da solução foi realizado de acordo com metodologia descrita em Vazoller (1995). Para isso, os sais foram dissolvidos em água Milli-Q sob fluxo de N₂ (100%). A solução foi esterilizada por filtração em sistema Millipore com membrana de 0,2 µm, e sob assepsia foi distribuída em frascos de Duran de 250 mL ou 500 mL, sob fluxo de N₂ (100%). Os frascos foram fechados com tampas de batoque de butila e armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz para uso posterior na preparação do substrato.

Tabela 8. Composição da solução de vitaminas.

Solução de Vitaminas para <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i>	
Componente	Quantidade
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina.HCl	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
Pantotenato de cálcio	0,005 g
Piridoxina.HCl	0,010 g
Vitamina B ₁₂	0,0001 g
Ácido p-aminobenzóico	0,005 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000 mL

Fonte: Vazoller (1995).

5. Soluções para a coloração de Gram (Coelho *et al.*, 2006):

a) Cristal Violeta

Solução A:

- Cristal violeta – 2,0 g
- Etanol 95 % - 80 mL

Solução B:

- Oxalato de amônio – 0,8 g
- Água destilada – 80 mL

Misturar as soluções A e B e esperar 24 horas.

b) Lugol

- Cristais de iodo - 1,0 g
- Iodeto de potássio – 2,0 g
- Água destilada – 300 mL

Triturar os cristais de iodo e o iodeto de potássio em um cadinho. Acondicionar água lentamente, e dissolver bem e guardar a solução em um vidro escuro.

c) Safranina

Solução Estoque

- Safranina – 2,5 g

- Etanol 95 % - 100 mL

Solução de Uso

- Solução de estoque – 10 mL
- Água destilada – 90 mL

d) Etanol 95 %

A solução poderá ser preparada a partir do etanol absoluto ou poderá ser comprada já preparada.

6. Solução Tampão B para análise de sulfato (Foresti et al, 2005):

- Em Becker de 1 L, adicionar 500 ml de água destilada;
- Dissolver 30 g de cloreto de magnésio;
- Dissolver 5 g de acetato de sódio;
- Dissolver 1 g de nitrato de potássio;
- Dissolver 0,111 g de sulfato de sódio;
- Adicionar 20 mL de ácido acético;
- Completar o volume até 1000 mL.

7. Protocolo de extração de DNA total do solo e água do kit Power Soil[®] DNA Isolation (MOBIO Laboratories, Inc.).

- 1- Identificar e filtrar em sistema de filtração as amostras de água e colocar nos tubos Power Bead Tubes;
- 2- Adicionar 60 µL de Solution C1, homogeneizar as amostras no vortex por cerca de 1 minuto. Se a Solution C1 apresentar precipitado, aquecer até 60 °C antes do uso;
- 3- Homogeneizar duas vezes a 6.0 por 40 segundos no Fast Prep[™];
- 4- Colocar as amostras no gelo;
- 5- Centrifugar a 14000 rpm por 30 segundos à temperatura ambiente;
- 6- Transferir o sobrenadante para tubos novos e limpos (Collection Tube). O sobrenadante esperado deve ter entre 400 – 500 µL;
- 7- Adicionar 250 µL da Solution C2, e homogeneizar em vortex por 5 segundos. Incubar à 4 °C por 5 minutos;
- 8- Centrifugar a 14000 rpm por 1:30 minuto a temperatura ambiente;

- 9- Transferir 640 μL do sobrenadante para tubos novos e limpos (Collection Tube). Evitar ressuspender o pellet e misturar a fase superior leitosa a sua amostra;
- 10- Adicionar 200 μL da Solution C3 e homogeneizar em vortex rapidamente. Incubar à 4 °C por 5 minutos;
- 11- Centrifugar a 14000 rpm por 1:30 minuto à temperatura ambiente;
- 12- Transferir 750 μL do sobrenadante para tubos novos e limpos (Collection Tube). Evitar ressuspender o pellet;
- 13- Homogeneizar a Solution C4 antes de usar. Adicionar 1200 μL da Solution C4 ao sobrenadante e homogeneizar em vortex por 5 segundos;
- 14- Transferir aproximadamente 675 μL para um tubo Spin Filter, e centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. Descartar a fase aquosa da parte inferior do tubo. Repetir este procedimento três vezes;
- 15- Adicionar 500 μL da Solution C5 e centrifugar a 14000 rpm por 30 segundos à temperatura ambiente;
- 16- Descartar a fase aquosa da parte inferior do tubo;
- 17- Centrifugar novamente a 14000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente;
- 18- Remover cuidadosamente o Spin Filter e colocar em um novo tubo de 2 mL (Collection Tube). Evitar transferir resíduo da Solution C5 para o Spin Filter;
- 19- Adicionar 100 μL de Solution C6. Centrifugar novamente a 14000 rpm por 30 segundos à temperatura ambiente;
- 20- Descartar o Spin Filter e estocar o DNA a -4 °C antes de usar.